



**PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN BIOCIENCIAS MOLECULARES**

**VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA  
PORCINA: PATOGÉNESIS Y PROTECCIÓN**

**TESIS DOCTORAL**  
**Alejandro Pascual Iglesias**  
**Madrid, 2019**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

# **VIRUS DE LA DIARREA EPIDÉMICA PORCINA: PATOGÉNESIS Y PROTECCIÓN**

**Memoria presentada por el Licenciado en Biología D. Alejandro Pascual Iglesias, adscrita al Departamento de Biología Molecular, para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.**

**El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Sonia Zúñiga Lucas y Luis Enjuanes Sánchez.**

**Madrid, 2019**



**El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la codirección de los Drs. Sonia Zúñiga Lucas y Luis Enjuanes Sánchez.**

**Madrid, 2019**

**Fdo. Luis enjuanes Sánchez**

**Fdo. Sonia Zúñiga Lucas**

## AGRADECIMIENTOS

Justo ahora que voy a terminar este viaje que emprendí hace años, me he parado a pensar en todas las personas que han contribuido en mayor o menor grado, en que haya podido alcanzar la meta.

En primer lugar, quiero agradecerle a Luis, líder del grupo de investigación y director de mi tesis, que me haya dado la oportunidad de entrar en el mundo de la ciencia y realizarla, así como su guía en el amplio sentido de la palabra y por saber transmitirme la forma en que se trabaja en este ámbito. Nunca olvidaré todo lo que me has enseñado.

También a Isabel Sola, como codirectora del grupo, por sus respuestas a cualquier pregunta en cualquier momento y la transmisión de todo su conocimiento en virología.

Por supuesto a Sonia, directora de mi tesis y con la que he trabajado, codo con codo, durante estos casi 6 años. Gracias por estar ahí cuando lo he necesitado, solucionar los problemas tanto experimentales como de escritura, presentación de seminarios y, sobre todo, por aportar la parte organizativa que sin duda me faltaba.

Marga, gracias por haber cuidado de mi y haberme facilitado todos los papeleos y trámites de los que, sinceramente, no tenía ni idea.

A mis compañeros del laboratorio, gracias a los cuales he podido seguir adelante. Primero y no solo por orden cronológico, a Carlos "mayor", mi mentor en mis primeras horas (y en otras tantas) en este grupo. Gracias por enseñarme a hacerlo prácticamente todo y también por todas las horas que me has aguantado, y acompañado con la mejor música en la Zona C. A los que se fueron tras la lectura de su tesis, pero me acogieron en mis primeros momentos: a José Luis, que fue mi primer profesor en la parte experimental y me ayudó a encajar en el grupo nada más llegar, muchas gracias por haber sido tan atento. A Josema, que además de compañero se convirtió en un gran amigo, muchas gracias por todas las risas y los momentazos en el gimnasio en los que ibas a tu ritmo. A JAR, que a pesar de empezar con mal pie, también acabó siendo una parte importante de mi entorno, y sobre todo gracias por dejar tan limpia la centrifuga. Martina, que, pese a que me llamasen "Pascu" a cada momento, me supiste enseñar no solo experimentalmente, sino a que es posible no llorar en todas las películas que vea en el cine. Lucía, gracias por aportar la parte más responsable a mi trabajo y enseñarme a ser más fuerte. Charly, como no podía ser de otro modo, gracias por todas las charlas, por compartir mi whovianismo y ayudarme a soportar días malos. Raúl, no hay en este centro nadie que comprenda mi gusto retro como tú, aunque no te guste Bohemian Rhapsody de Queen, pero nadie es perfecto... gracias por comprenderme casi sin decirte nada. A mis compañeros que llevan su tesis en paralelo, Cantón, desde el primer día, cada frikismo, las risas, la comida halloweenera, esos jueves de desayuno especial...ha llegado el Closing Time, gracias. Paco, aunque odias que te llamen así, eres el Steve Rogers que todo el mundo necesita, aunque no el que merezco, no ha habido día que yéndonos juntos no me hayas aguantado, y me hayas ayudado: el escudo te viene de perlas. Jose, con los múltiples alias que pueda darte, sabes perfectamente lo que eres para mi, lo que significas y todo lo que compartimos y compartiremos en el futuro. Gonzalo, aunque breve,

supusiste un gran apoyo y ese toque de "la hierbas" que necesitaría cualquiera para no volverse loco. Li, thanks for being my "sister" on this lab, for the "chuches", all the jokes and I hope you will have a brilliant future.

Dentro del CNB ha habido gente muy importante que me ha aguantado tanto como yo a todos ellos, y me ha aportado en mayor o menor medida, muchos aspectos durante estos años: Carol, creo que sin ti no habría mantenido la energía en un grandísimo porcentaje de mis días, y creo que poca gente cree tanto en mi como tú. Gracias a mis colegas predocs, a María, a Lazars (nunca perdamos nuestros debates ideológicos, por favor), a Carlos Briz. A Julia y Elena, como tándem cómico.

Por último, aunque no por ello menos importante, gracias a las personas de mi entorno fuera del mundo académico, a mis padres por encima de todo, gracias por creer en mi desde que era pequeño y darme ese empujón que me faltaba y enseñarme a ser independiente. Esta tesis es también parte vuestra. A mis abuelos, por estar ahí cuando mis padres no podían, con una mención muy muy especial a ti, abuela, que se que estés donde estés, sigues cuidándome. A mis amigos, porque me habéis comprendido durante estos años, aunque no siempre he sido fácil, sobre todo personas como Álvaro, ya que no nos hemos separado desde los 2 años, y espero que siempre siga así. Alice, o Álix, mi simbiote, gracias de corazón.

<b>I. ÍNDICE .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ABREVIATURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>III. RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>IV. SUMMARY .....</b>	<b>14</b>
<b>V. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>18</b>
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS .....	18
1.1. Clasificación taxonómica .....	18
1.2. Enfermedades causadas por CoVs. Importancia socioeconómica .....	19
1.3. Estructura del virión .....	21
1.4. Estructura del genoma y expresión génica .....	24
1.5. Ciclo infectivo .....	27
2. CORONAVIRUS ENTÉRICOS PORCINOS .....	29
2.1. Enfermedades causadas por coronavirus entéricos porcinos ....	29
2.2. Clasificación y epidemiología .....	30
3. PEDV .....	32
3.1. Evolución y clasificación .....	32
3.2. Respuesta inmune y protección frente a PEDV .....	33
3.3. Vacunas frente a PEDV .....	34
3.1.1. Vacunas de subunidades .....	35
3.1.2. Vacunas inactivadas .....	35
3.1.3. Vacunas vivas .....	36
4. SESGO EN LOS PARES DE CODONES Y ATENUACIÓN VIRAL ..	37

<b>VI. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
1. MANEJO DE CÉLULAS .....	45
1.1. Líneas celulares .....	45
1.2. Cultivos de líneas celulares eucariotas .....	45
2. VIRUS .....	45
2.1. Aislados virales .....	45
2.2. Crecimiento y titulación de virus en cultivos celulares .....	46
2.3. Purificación parcial de los virus TGEV y PEDV .....	46
3. BACTERIAS .....	47
3.1. Cepas y cultivos de bacterias .....	47
3.2. Preparación de bacterias competentes .....	47
3.3. Transformación de bacterias mediante electroporación .....	48
4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA .....	48
4.1. Plásmidos .....	48
4.2. Manipulación y purificación de plásmidos .....	48
4.3. Enzimas de restricción y modificación del DNA .....	49
4.4. Amplificación de DNA mediante PCR .....	49
4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	49
5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS .....	50
5.1. Construcción de plásmidos para la introducción del gen de la S de PEDV en el clon infectivo del rTGEV .....	50
5.2. Construcción de plásmidos para el ensamblaje del clon infectivo del PEDV .....	51
5.3. Construcción de plásmidos para la modificación del codon pair bias (CPB) del gen de la N de PEDV .....	52
5.3.1. <i>Diseño de las secuencias mutantes</i> .....	52

5.3.2. Construcción de plásmidos para la mutación del gen N de PEDV .....	53
5.4. Construcción de plásmidos para la duplicación de las TRSs .....	53
5.5. Construcción de plásmidos para la mutación de la proteína E ...	
6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA .....	54
6.1. Extracción y purificación del RNA total intracelular .....	54
6.2. Análisis del RNA mediante RT-PCR .....	55
7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS Y RESCATE DE VIRUS RECOMBINANTES .....	56
8. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	57
8.1. Inmunomicroscopía de fluorescencia indirecta (inmunofluorescencia) .....	57
8.2. Inmunodetección de proteínas ( <i>Western Blot</i> ) .....	58
9. ENSAYOS IN VIVO .....	59
9.1. Declaración ética .....	59
9.2. Análisis de la virulencia .....	59
9.3. Análisis de la protección .....	59
9.4. Seguimiento de la enfermedad y toma de muestras .....	60
9.5. Extracción de RNA de intestino .....	60
9.6. Extracción de RNA de heces .....	61
9.7. Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) .....	61
9.8. Evaluación de la capacidad neutralizante de los sueros .....	62
9.9. Análisis histopatológico .....	62
10. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL rPEDV-CM1 .....	62
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	66
<b>VIII. RESULTADOS .....</b>	<b>70</b>
1. VACUNAS VIVAS MODIFICADAS BASADAS EN UN VIRUS TGEV-PEDV QUIMÉRICO .....	70



1.1. Diseño y construcción de un virus TGEV-PEDV quimérico .....	70
1.2. Virulencia de los virus quiméricos .....	72
1.3. Estabilidad genética del virus rTGEV-RS-SPEDV .....	75
1.4. Protección conferida por el virus rTGEV-RS-SPEDV frente a la infección por PEDV .....	77
1.5. Respuesta humoral inducida por el virus rTGEV-RS-SPEDV .....	80
2. GENERACIÓN DE UN CLON INFECTIVO DE PEDV .....	84
2.1. Ensamblaje del cDNA de PEDV en un BAC .....	84
2.2. Rescate del virus recombinante rPEDV-CM1 y caracterización en cultivos celulares .....	85
2.3. Virulencia del virus rPEDV-CM1 .....	86
3. DESARROLLO DE UNA VACUNA VIVA ATENUADA BASADA EN EL CLON INFECTIVO DE PEDV .....	90
3.1 Generación de virus PEDV con cambios en el CPB del gen N ...	91
3.1.1. <i>Diseño de mutantes NCPB de PEDV</i> .....	91
3.1.2. <i>Caracterización in vitro de los virus mutantes rPEDV-NCPB ..</i>	92
3.1.3. <i>Virulencia de los virus mutantes rPEDV-NCPB</i> .....	96
3.1.4. <i>Respuesta inmune innata inducida por los mutantes rPEDV-NCPB</i> .....	100
3.2. Generación de virus rPEDV con duplicaciones de las TRSs .....	103
3.2.1. <i>Identificación de las TRSs en el genoma del rPEDV-CM1</i> ....	103
3.2.2. <i>Rescate y caracterización de los virus rPEDV-RS-N2</i> .....	105
3.3. Generación de virus rPEDV con eliminación de secuencias cortas en el gen de la proteína E .....	107
<b>IX. DISCUSIÓN .....</b>	<b>110</b>
1. EL VIRUS rTGEV-RS-SPEDV COMO CANDIDATO A VACUNA .....	110
2. INGENIERÍA GENÉTICA Y VACUNAS PARA PEDV .....	111
3. CAMBIO EN EL CPB Y MODULACIÓN DE LA VIRULENCIA .....	114
4. ESTRATEGIAS ADICIONALES PARA LA ATENUACIÓN DE PEDV .....	117

<b>X. CONCLUSIONES .....</b>	<b>120</b>
------------------------------	------------

<b>XI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>124</b>
-------------------------------	------------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Taxonomía de los coronavirus .....	19
<b>Figura 2.</b> Ecología de los coronavirus .....	21
<b>Figura 3.</b> Estructura del virión y genoma del virus causante de la diarrea epidémica porcina (PEDV) .....	22
<b>Figura 4.</b> Modelo de transcripción en coronavirus .....	28
<b>Figura 5.</b> Ciclo infectivo de los coronavirus .....	29
<b>Figura 6.</b> Coronavirus entéricos porcinos .....	31
<b>Figura 7.</b> Generación de los virus rTGEV-SPEDV .....	65
<b>Figura 8.</b> Cinética de crecimiento de los virus rTGEV-SPEDV y rTGEV- RS-SPEDV en cultivos celulares .....	66
<b>Figura 9.</b> Replicación de los virus rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV in vivo .....	67
<b>Figura 10.</b> Virulencia del rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV .....	68
<b>Figura 11.</b> Daño intestinal en lechones inoculados con rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV.....	69
<b>Figura 12.</b> Estabilidad genética del virus rTGEV-RS-SPEDV .....	71
<b>Figura 13.</b> Ganancia de peso en animales vacunados .....	73
<b>Figura 14.</b> Título viral de PEDV en el tracto entérico de los animales vacunados .....	74
<b>Figura 15.</b> Respuesta humoral inducida en animales vacunados .....	76
<b>Figura 16.</b> Anticuerpos neutralizantes en los animales vacunados .....	77
<b>Figura 17.</b> Ensamblaje del clon infectivo de PEDV .....	79
<b>Figura 18.</b> Cinética de crecimiento del virus rPEDV-CM1 .....	80
<b>Figura 19.</b> Replicación del virus rPEDV-CM1 in vivo .....	81
<b>Figura 20.</b> Virulencia del rPEDV-CM1 .....	82
<b>Figura 21.</b> Daño intestinal en lechones inoculados con rPEDV-CM1 .....	83
<b>Figura 22.</b> Estrategias de atenuación seleccionadas para el diseño del candidato a vacuna basado en el virus rPEDV-CM1 .....	84
<b>Figura 23.</b> CPB para los genes porcinos .....	85

<b>Figura 24.</b> Efecto citopático en células infectadas con los virus mutantes rPEDV-NCPB .....	87
<b>Figura 25.</b> Cinéticas de crecimiento de los virus mutantes rPEDV-NCPB en cultivos celulares .....	88
<b>Figura 26.</b> Análisis de la síntesis de RNA viral de los mutantes rPEDV- NCPB en cultivos celulares .....	89
<b>Figura 27.</b> Acumulación de la proteína N en células infectadas con los mutantes rPEDV-NCPB .....	90
<b>Figura 28.</b> Replicación de los virus mutantes rPEDV-NCPB in vivo .....	91
<b>Figura 29.</b> Virulencia de los virus mutantes rPEDV-NCPB .....	93
<b>Figura 30.</b> Análisis de la expresión de citoquinas en los animales infectados por los mutantes rPEDV-NCPB .....	96
<b>Figura 31.</b> Identificación de las TRSs del virus rPEDV-CM1 .....	98
<b>Figura 32.</b> Diseño de las duplicaciones de las TRSs e introducción de sitios de restricción .....	99
<b>Figura 33.</b> Efecto citopático en células infectadas con los virus mutantes rPEDV-3RS-N2 y rPEDV-4RS-N2 .....	100
<b>Figura 34.</b> Cinética de crecimiento de los virus rPEDV-N2, rPEDV-2RS- N2, rPEDV-3RS-N2 y rPEDV-4RS-N2 .....	100
<b>Figura 35.</b> Diseño de virus rPEDV-N2 con eliminación de secuencias en la proteína E .....	102

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Plásmidos utilizados para el ensamblaje del cDNA infectivo de PEDV .....	51
<b>Tabla 2.</b> Resumen de los mutantes en el CPB del gen N .....	52
<b>Tabla 3.</b> Ensayos Taqman® específicos utilizados para cuantificar RNAs virales .....	55
<b>Tabla 4.</b> Ensayos Taqman® comerciales utilizados para la cuantificación de RNA celular .....	56
<b>Tabla 5.</b> Lista de anticuerpos empleados en inmunodetección de proteínas .....	58
<b>Tabla 6.</b> Lista de oligonucleótidos de PEDV utilizados en PCR y secuenciación .....	63
<b>Tabla 7.</b> Grupos de animales en el ensayo de protección .....	72
<b>Tabla 8.</b> Características de los mutantes NCPB .....	

## ***ABREVIATURAS***

2'-O-MTasa	2'-O-ribosa metiltransferasa
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
APN	Aminopeptidasa N
ATP	Adenosín trifosfato
BAC	Cromosoma artificial de bacterias
BatCoV	Coronavirus de murciélagos
BCoV	Coronavirus bovino
BHK	Línea celular de riñón de hámster
bp	Pares de bases
BSA	Seroalbúmina bovina
CCoV	Coronavirus canino
cDNA	Copia de DNA
CMV	Citomegalovirus
CoV	Coronavirus
CS	Hexanucleótido central conservado
CTD	Dominio C-terminal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DENV	Virus del dengue
dpi	Días después de la infección
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMV	Vesícula de doble membrana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTM	Dominio transmembrana
DTT	Ditiotreitol
ECM	Matrix extracelular
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
EE.UU.	Estados unidos
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas
ER	Retículo endoplásmico
ERGIC	Compartimento intermedio entre retículo endoplasmático y el Golgi
ExoN	Exonucleasa
FBS	Suero fetal bovino
FeCoV	Coronavirus felino
GFP	Proteína fluorescente verde
Golgi	Aparato de Golgi
gRNA	RNA genómico
GUSB	Beta-glucuronidasa
HCoV	Coronavirus humano
hpi	Horas después de la infección
hpt	Horas después de la transfección
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HRP	Peroxidasa del rábano picante
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IRF	Factor regulador de interferón
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MERS	Síndrome respiratorio de Oriente Medio
MHV	Virus de la hepatitis del ratón
moi	Multiplicidad de infección
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
NendoU	Endonucleasa
NF-kB	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas
nsp	Proteína no estructural
nt	Nucleótido

## Abreviaturas

NTD	Dominio N-terminal
OD	Densidad óptica
ORF	Fase de lectura abierta
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDCoV	Coronavirus porcino delta/ deltacoronavirus porcino
PEDV	Virus de la diarrea epidémica porcina
PFA	Paraformaldehído
pfu	Unidades formadoras de placas
poliA	Tramo de poliadeninas
pp	Poliproteína
PRCV	Coronavirus respiratorio porcino
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RLT	Tampón de lisis para el RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rPEDV	Virus recombinante de la diarrea epidémica porcina
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RS	Sentido reverso
RSV	Virus respiratorio sincitial
RT	Transcripción reversa
RT-PCR	PCR acoplada a transcripción reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativa acoplada a transcripción reversa
RTC	Complejo de replicación-transcripción
rTGEV	Virus recombinante de la gastroenteritis porcina transmisible
SARS	Síndrome respiratorio agudo y grave
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
sgmRNA	RNA subgenómico mensajero
ssRNA	RNA de cadena sencilla
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TCID <sub>50</sub>	Dosis infectiva en cultivos celulares/necesaria para causar el 50% de muerte
TGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible
Tm	Temperatura de fusión
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRS	Secuencia reguladora de la transcripción
TTBS	Tampón salino con tris-clorhídrico y tween 20
U	Unidades
UTR	Región no traducida
UV	Ultravioleta
VS	Sentido viral
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WB	<i>Western blot</i>
wt	Tipo silvestre



***RESUMEN***

El virus de la diarrea epidémica porcina (PEDV) es un coronavirus entérico que causa una alta tasa de morbilidad y de mortalidad, que puede llegar al 100% en lechones de menos de una semana de edad. Las cepas epidémicas virulentas que circulan actualmente causan graves pérdidas económicas a nivela mundial. Aunque se han utilizado extensivamente vacunas inactivadas y vacunas vivas atenuadas, la aparición de las cepas epidémicas altamente virulentas y los brotes recurrentes, que ocurren incluso en granjas con animales vacunados, resaltan la necesidad de nuevas vacunas eficaces y seguras. Se ha descrito que las vacunas vivas atenuadas son las más eficaces para proteger frente al PEDV porque inducen una respuesta inmune duradera en mucosas. El desarrollo de vacunas mediante ingeniería genética, que contengan modificaciones definidas en el genoma, es una aproximación racional prometedora para el desarrollo de nuevas vacunas. En ese sentido, en esta tesis doctoral se han diseñado virus recombinantes que podrían ser candidatos a vacuna. En primer lugar, un virus atenuado basado en el genoma del virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), que expresa una proteína de la espícula (S) quimérica con la de una cepa virulenta de PEDV (rTGEV-RS-SPEDV). Este virus estaba atenuado en lechones de 5 días, dado que los animales infectados no perdieron peso, ninguno de ellos murió y el no virus causaba daño en el intestino de los animales infectados. Es más, el virus rTGEV-RS-SPEDV protegió frente al desafío con una cepa virulenta de PEDV, reduciendo los títulos de virus del desafío en el yeyuno y con niveles de RNA del virus de desafío indetectables en las heces. Además, indujo una respuesta inmune humoral específica para PEDV, incluidos los anticuerpos neutralizantes. Por otro lado, se ha generado un cDNA infectivo para PEDV que daba lugar a un virus recombinante virulento. Usando este cDNA infectivo, se ha generado una colección de virus sintéticos con cambios en el sesgo en el uso de los pares de codones (CPB) del gen de la nucleocápsida (N). Estos virus recombinantes presentaron un amplio rango de virulencia, lo que los convierte en herramientas muy valiosas para el estudio de las bases moleculares de la patogénesis del PEDV. Uno de ellos, rPEDV-N2, creció eficientemente en el intestino de los animales infectados y estaba atenuado dado que el 100% de los animales sobrevivieron a la infección. Por tanto, este virus es la base para un candidato a vacuna, que incluiría estrategias de atenuación adicionales, alguna de las cuales se contempla en esta tesis

## ***SUMMARY***

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is an enteric coronavirus causing a high morbidity and mortality rates up to 100% in young piglets. The circulating epidemic virulent PEDV strains cause huge economic losses worldwide. Although both inactivated and live attenuated vaccines have been extensively used, the emergence of the epidemic highly virulent strains and the recurrent outbreaks even in vaccinated farms highlight the need of novel effective and biosafe vaccines. It has been described that modified live vaccines are the most protective ones, as they induce a long-lasting mucosal immune response. Engineering of genetically defined live attenuated vaccines is a rational promising approach for novel vaccine development. In that line, during this thesis, different recombinant viruses that may be used as vaccine candidates were developed. First, an attenuated virus based on the transmissible gastroenteritis virus (TGEV) genome, expressing a chimeric spike (S) protein from a virulent US PEDV strain (rTGEV-RS-SPEDV). This virus was attenuated in highly-sensitive 5-day-old piglets, as infected animals did not lose weight, none of them died and the virus caused very minor tissue damage compared with a virulent virus. Moreover, the rTGEV-RS-SPEDV virus protected against challenge with a virulent PEDV strain, reducing challenge virus titers in jejunum and leading to undetectable challenge virus RNA levels in feces. The rTGEV-RS-SPEDV virus induced a humoral immune response specific for PEDV, including neutralizing antibodies. On the other hand, a PEDV infectious cDNA was engineered, leading to a recombinant virulent virus. Using this infectious cDNA clone, a set of synthetic viruses was generated, containing changes in the codon pair bias (CPB) of nucleocapsid (N) gene. The recombinant mutant viruses showed a broad range of virulence, being valuable tools for the analysis of the molecular basis of PEDV pathogenesis. One of the mutant viruses, rPEDV-N2, grew efficiently in the jejunum of the infected animals and it was attenuated as 100% of the infected animals survived. Therefore, this virus is the base for a promising vaccine candidate that would also include additional attenuating strategies, some of them preliminarily studied in this thesis

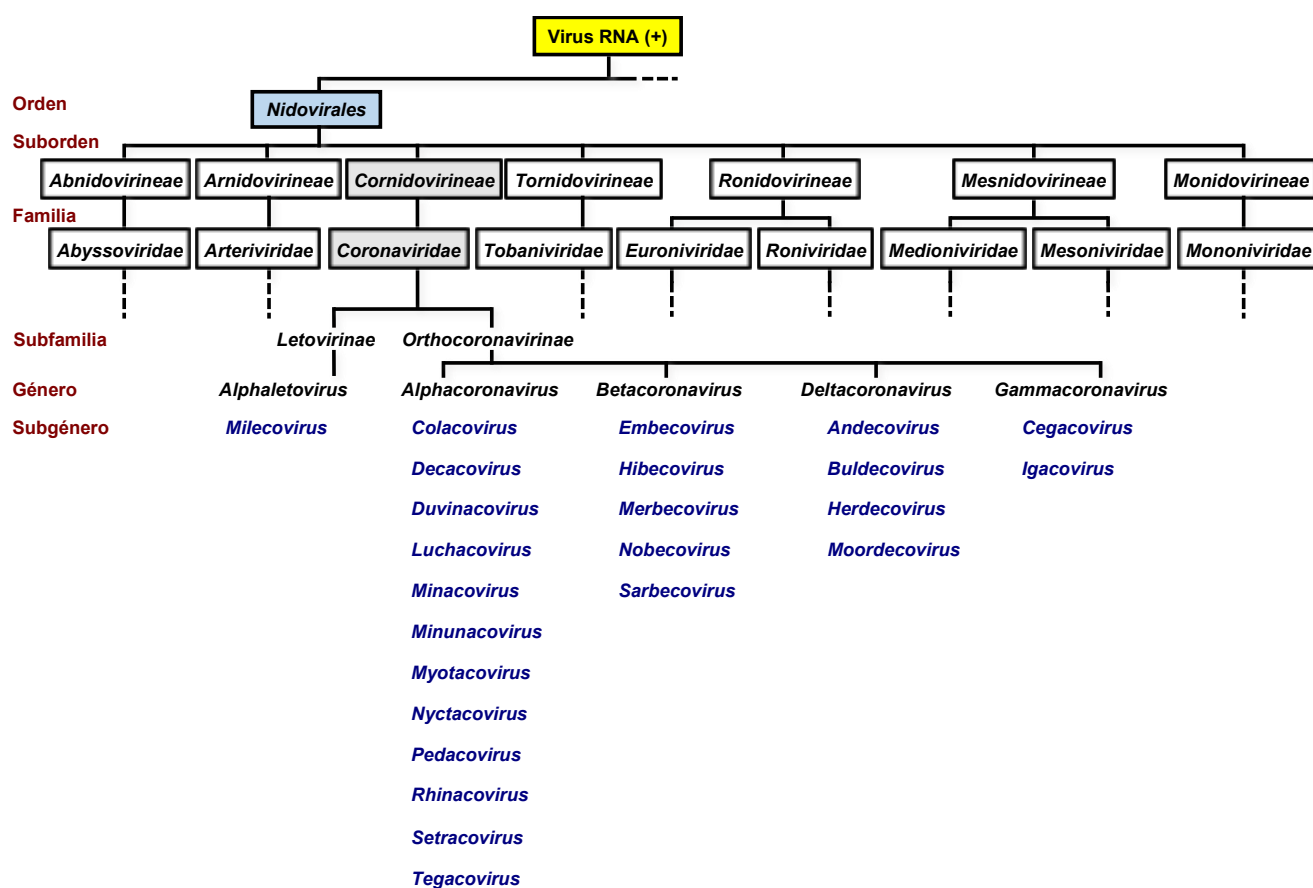
# ***INTRODUCCIÓN***

# 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CORONAVIRUS

## 1.1. Clasificación taxonómica

Los coronavirus (CoVs) son virus con envuelta que contienen un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, que se clasifican dentro de la familia *Coronaviridae* (Siddell, S. G., y col., 2019); Wong, A. C. P., y col. (2019). Esta familia pertenece al orden *Nidovirales*, cuya característica común es la producción de mRNAs subgenómicos (sg mRNAs) 3' co-terminales o anidados, lo que da nombre al orden (de Groot, R. J., y col., 2012; Enjuanes, L., y col., 2008).

Actualmente, el orden *Nidovirales* comprende 88 especies virales que se clasifican en 9 familias incluidas a su vez en 7 subórdenes distintos (Fig. 1) (Siddell, S. G., y col., 2019; Wong, A. C. P., y col., 2019).



**Figura 1. Taxonomía de los CoVs.** Se indican los diferentes subórdenes y familias que forman parte del orden *Nidovirales*. Dentro de la familia *Coronaviridae*, se indican las subfamilias *Letovirinae* y *Orthocoronavirinae* así como los géneros y subgéneros dentro de éstas.

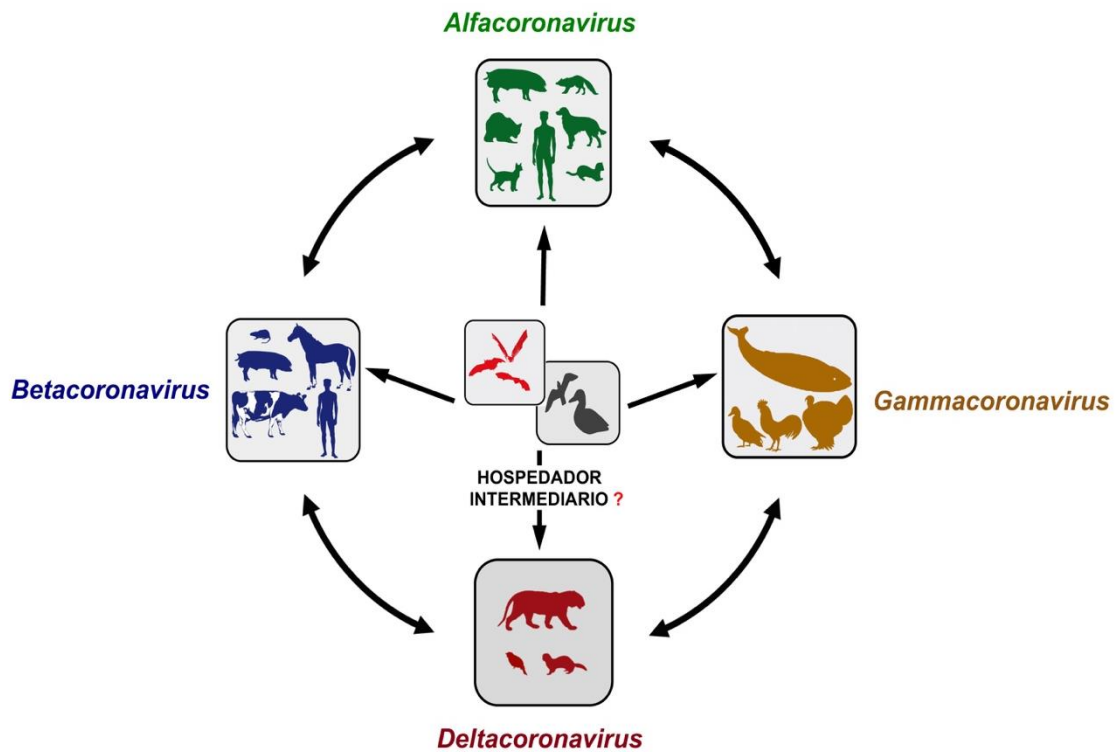
Los nidovirus infectan una amplia variedad de hospedadores, tanto vertebrados como invertebrados, incluyendo mamíferos, aves, anfibios, peces, reptiles, artrópodos, moluscos y helmintos. Como ocurre con otras familias de virus, se continúan describiendo nuevos genomas de nidovirus debido a la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva (Bukhari, K., y col., 2018;Saber, A., y col., 2018). Desgraciadamente, las características biológicas y la patogénesis de la mayoría de los nuevos nidovirus permanecen sin caracterizar (Lauber, C., y col., 2012);Shi, M., y col. (2018);(Walker, P. J., y col., 2005).

Dentro de la familia *Coronaviridae*, la subfamilia *Letovirinae* está formada por el género *Alphaletovirus*, subgénero *Milecovirus*, que contiene una única especie de virus detectado en renacuajo (Bukhari, K., y col., 2018). La subfamilia *Orthocoronavirinae* está constituida por los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* e incluye más de 20 especies que infectan a un amplio rango de vertebrados, incluyendo mamíferos y aves (Fig. 2) (de Groot, R. J., y col., 2013). Se ha descrito que tanto los murciélagos como las aves son los reservorios de los CoVs (Fig. 2). En concreto, al igual que sucede con virus de otras familias, los murciélagos son el mayor reservorio de coronavirus en todo el mundo (Fig. 2), estimándose que un 10% de estos animales son portadores de coronavirus, en comparación con el 0.2% de otros animales estudiados (Anthony, S. J., y col., 2017;Drosten, C., y col., 2014). Cabe destacar el papel de los murciélagos como hospedadores de CoVs dado que, debido a las interfaces murciélago-animal y murciélago-humano, estos mamíferos tienen un papel fundamental en la transmisión inter-especies y en la emergencia de nuevos CoVs potencialmente virulentos (Wong, A. C. P., y col., 2019).

### **1.2. Enfermedades causadas por CoVs. Importancia socioeconómica**

Los CoVs humanos son responsables de, aproximadamente, el 15% de los resfriados comunes, causados principalmente por los virus HCoV-229E, HCoV-OC43 y HCoV-NL63, que ocasionalmente pueden derivar en enfermedades pulmonares más graves en recién nacidos, personas mayores o individuos inmunodeprimidos (Garbino, J., y col., 2006;Lee, J.y Storch, G. A., 2014;Walsh, E. E., y col., 2013). En el año 2002, emergió el virus causante del síndrome

respiratorio agudo y grave (SARS-CoV), que se diagnosticó en 8422 enfermos de 30 países y dejó un balance de 916 fallecidos (Drosten, C., y col., 2003; Rota, P. A., y col., 2003). Esto atrajo la atención mediática y científica hacia los



**Figura 2. Ecología de los coronavirus.** En la imagen se presenta un resumen de las especies animales hospedadores para los diferentes géneros de CoVs (en diferentes colores alrededor del esquema circular) y los reservorios que los transmiten de unas especies a otras (en el centro).

CoVs (Song, Z., y col., 2019) y llevó a la identificación de nuevos CoVs humanos, como el HCoV-HKU1 y el HCoV-NL63, causantes de bronquiolitis y neumonías relativamente graves (van der Hoek, L., y col., 2004; Woo, P. C., y col., 2005). En 2012 emergió un nuevo CoV humano, el virus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Annan, A., y col., 2013; Assiri, A., y col., 2013). Este CoV produce neumonías graves acompañadas ocasionalmente de patología renal. Hasta el momento, este virus ha causado 2458 casos en 27 países, con más de 840 muertes (<http://www.who.int/emergencies/mers-cov/en>, 3 septiembre 2019). Como se ha expuesto anteriormente, en murciélagos se han identificado antecesores comunes recientes de los CoVs de los géneros  $\alpha$  y  $\beta$ , incluyendo CoVs muy similares al SARS-CoV y al MERS-CoV lo que sugiere que los murciélagos constituyen el reservorio natural de los CoVs humanos (Annan,

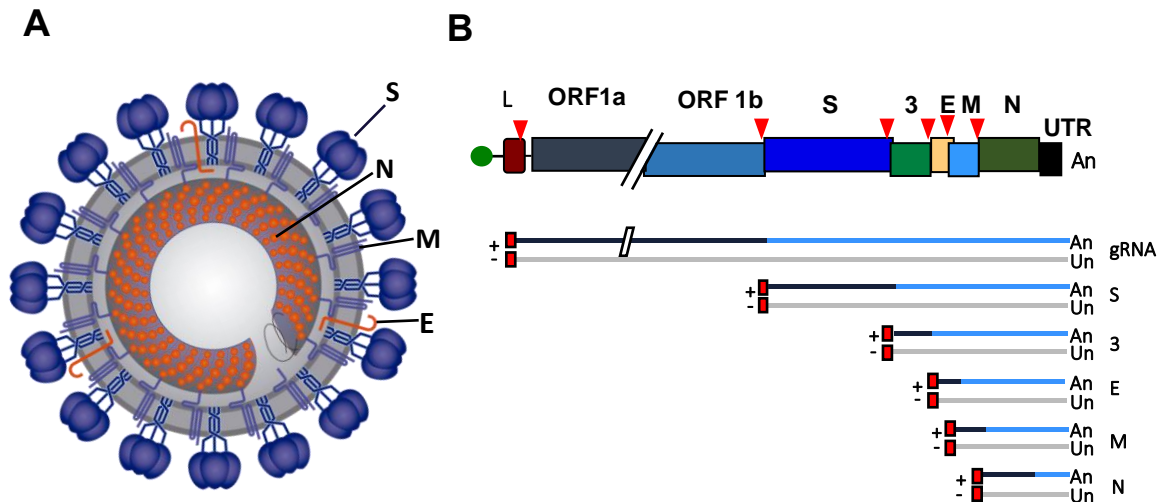


A., y col., 2013;Dominguez, S. R., y col., 2007;Gloza-Rausch, F., y col., 2008;Tong, S., y col., 2009). Las últimas zoonosis causadas por CoVs indican que estos virus tienen facilidad para atravesar la barrera de especie, lo cual destaca la relevancia de los CoVs como patógenos humanos emergentes (Banerjee, A., y col., 2019;Coleman, C. M.y Frieman, M. B., 2014;Graham, R. L., y col., 2013).

En animales, los CoVs generan importantes pérdidas económicas en explotaciones ganaderas, además de infectar animales de compañía y animales de experimentación (Cavanagh, D., 2005;Lai, M. M. C., y col., 2007;Perlman, S.y Netland, J., 2009). Especialmente relevantes en esta tesis, los CoVs entéricos porcinos, que se tratan específicamente en el apartado 2 de esta sección.

### 1.3. Estructura del virión

Los CoVs son virus esféricos, de entre 120 y 160 nm de diámetro, que presentan una envuelta lipídica en la que se inserta un conjunto de proteínas estructurales comunes a todos los CoVs: la proteína de la espícula (S), la proteína de membrana (M) y la proteína de la envuelta (E) (Fig. 3A) (de Groot, R. J., y col., 2012).



**Figura 3. Estructura del virión y genoma del virus causante de la diarrea epidémica porcina (PEDV).** (A) Modelo de la estructura del virión de PEDV en el que se distinguen dos dominios estructurales: la envuelta lipídica en la que se insertan las proteínas S, E, M y la nucleocápsida helicoidal formada por el RNA genómico (gRNA) asociado a la proteína N. (B) En la parte superior se muestra el esquema del genoma del PEDV, incluyendo la estructura 5'cap (verde), la

secuencia líder (L) y los genes virales (ORF1a, ORF1b, S, 3, E, M y N), la región 3' no traducida (UTR) y la cola de poliadenina (An). Los triángulos rojos invertidos en la parte superior representan las secuencias reguladoras de la transcripción (TRSs). En la parte inferior se muestran los RNAs subgenómicos (sgRNAs) resultantes de la transcripción. Se indica su polaridad y estructuras terminales comunes. Las secuencias líder y antilíder se muestran en rojo. En azul oscuro se muestra la parte que se traduce de cada mRNA subgenómico.

Además, algunos coronavirus presentan en la envuelta viral otras proteínas específicas de género, como las proteínas accesorias 3a, 6, 7a y 7b en el caso del SARS-CoV (Huang, C., y col., 2006;Huang, C., y col., 2007;Schaecher, S. R., y col., 2007;Shen, S., y col., 2005), la proteína 3 en el caso del HCoV-NL63 (Muller, M. A., y col., 2010), o una proteína homóloga a la hemaglutinina en el virus de la hepatitis del ratón (MHV) (Brian, D. A.y Baric, R. S., 2005). En el interior del virión se encuentra la nucleocápsida, formada por el RNA genómico (gRNA) unido a la proteína de la nucleocápsida (N) (Fig. 3A) (de Groot, R. J., y col., 2012).

La proteína S es una glicoproteína de membrana de tipo I de 150-200 KDa. Funcionalmente se ensambla formando trímeros que constituyen las espículas, que son las estructuras más prominentes de la envuelta viral y confieren al virión su aspecto de corona, responsable del nombre de la familia (Delmas, B.y Laude, H., 1990). La proteína S media la unión del virión al receptor celular, permitiendo la entrada del virus en las células (Belouzard, S., y col., 2012;Gallagher, T. M.y Buchmeier, M. J., 2001;Heald-Sargent, T.y Gallagher, T., 2012;Li, F., 2016). Las modificaciones en la secuencia de la proteína S alteran el tropismo viral (Ballesteros, M. L., y col., 1997);(Sanchez, C. M., y col., 1999);(Phillips, J. J., y col., 1999);(Miura, T. A., y col., 2008);(Pascual-Iglesias, A., y col., 2019). Es más, el tropismo de especie se puede modificar reemplazando la proteína S de un CoV por la de otro alejado taxonómicamente (Kuo, L., y col., 2000;Ribes, J. M., y col., 2011;Sheahan, T., y col., 2008;van Beurden, S. J., y col., 2017). La proteína S es además la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (Delmas, B., y col., 1986;Jimenez, G., y col., 1986) y, de hecho, muchas vacunas se basan en la expresión de la proteína S completa o de dominios de la misma (Enjuanes, L., y col., 2016;Hain, K. S., y col., 2016;Oh, J., y col., 2014;Yuan, X., y col., 2017)

La proteína M es una glicoproteína de 29 a 36 KDa, y es el componente estructural más abundante del virión (Sturman, L. S., y col., 1980;Sturman, L. S.y V., H. K., 1977;Utiger, A., y col., 1995). Presenta un pequeño dominio N-terminal orientado hacia el exterior del virión, tres dominios transmembrana y un dominio C-terminal orientado hacia el interior del virión, que interacciona con la proteína N. La proteína M es fundamental en los procesos de morfogénesis y ensamblaje de los CoVs (Arndt, A. L., y col., 2010;Corse, E.y Machamer, C. E., 2003;Nguyen, V. P.y Hogue, B. G., 1997). Esta proteína también induce la producción de anticuerpos neutralizantes, aunque en menor grado que la proteína S (Jimenez, G., y col., 1986;Wesley, R. D., y col., 1988).

La proteína E es una proteína transmembrana de unos 10 KDa que se encuentra en los viriones en un número bajo de copias (20 moléculas/virión), pero se acumula abundantemente en la célula infectada donde participa, junto con la proteína M, en el ensamblaje y liberación de los viriones (Maeda, J., y col., 2001;Nguyen, V. P.y Hogue, B. G., 1997;Nieto-Torres, J. L., y col., 2011;Ruch, T. R.y Machamer, C. E., 2012). Su requerimiento es variable dependiendo de la especie de CoV. En el caso del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV) y del MERS-CoV la eliminación de la proteína E resulta en virus competentes en replicación, pero deficientes en propagación, mientras que en el MHV o el SARS-CoV, la proteína E no es esencial para la maduración y secreción de partículas infectivas (Almazan, F., y col., 2013;DeDiego, M. L., y col., 2011;Ortego, J., y col., 2002). La proteína E forma canales iónicos y es un factor de virulencia que modula la respuesta celular a estrés de retículo y la inflamación (DeDiego, M. L., y col., 2011;Jimenez-Guardaño, J. M., y col., 2014;Nieto-Torres, J. L., y col., 2014;Nieto-Torres, J. L., y col., 2015;Sun, M., y col., 2017;Surya, W., y col., 2015;Verdia-Baguena, C., y col., 2012;Xu, X., y col., 2013a).

La proteína N es una fosfoproteína de unos 40 KDa que se une al gRNA viral para formar la nucleocápsida helicoidal (Laude, H.y Masters, P. S., 1995). Esta proteína presenta una organización modular con dos dominios estructurados N-terminal (NTD) y C-terminal (CTD) separados por regiones desordenadas (Chang, C. K., y col., 2006). Se han identificado dominios de unión al RNA en la región NTD mientras que el CTD es necesario para la oligomerización, esencial para conferir estabilidad a la nucleocápsida (Chang, C. K., y col., 2006;Cong, Y.,

y col., 2015;McBride, R., y col., 2014;Zuniga, S., y col., 2007). Además de su función estructural, la proteína N tiene actividad chaperona de RNA (Zuniga, S., y col., 2009;Zuniga, S., y col., 2007) y tiene un papel fundamental en la síntesis de RNA viral (Almazan, F., y col., 2004;Liwnaree, B., y col., 2019;Schelle, B., y col., 2005). En particular, nuestro grupo ha descrito que la proteína N es esencial para la transcripción de CoVs, probablemente porque facilita el cambio de molde durante este proceso (Zuñiga, S., y col., 2010). Además, la proteína N desempeña múltiples funciones en la interacción virus-hospedador, modulando numerosos procesos celulares (McBride, R., y col., 2014;Surjit, M.y Lal, S. K., 2008;Zhang, Q.y Yoo, D., 2016;Zuñiga, S., y col., 2016). Estas actividades incluyen la desregulación del ciclo celular (Ding, Z., y col., 2014;Surjit, M., y col., 2006;Xu, X., y col., 2013b), la inhibición de la traducción (Peng, T. Y., y col., 2008;Tsai, T. L., y col., 2018a;Zhang, X., y col., 2014;Zhou, B., y col., 2008), la inducción de apoptosis (Ding, Z., y col., 2014;Shi, D., y col., 2017;Surjit, M., y col., 2004), la supresión del silenciamiento por RNA (Cui, L., y col., 2015), o el antagonismo de la ruta de degradación de mRNA mediada por mutación terminadora (NMD, por las siglas en inglés de *non-sense mediated mRNA decay pathway*) (Wada, M., y col., 2018). Además, la proteína N de CoV es un antagonista de interferon (IFN) (Ding, Z., y col., 2014;Hu, Y., y col., 2017;Kopecky-Bromberg, S. A., y col., 2007;Likai, J., y col., 2019;Ye, Y., y col., 2007) y modula la inflamación (Cao, L., y col., 2015b;Wu, Y. H., y col., 2014;Xu, X., y col., 2013b). Cabe destacar que se conoce poco de los mecanismos mediante los que la proteína N ejerce estas actividades, dado que su estudio en el contexto de la infección viral es muy complicado por ser una proteína esencial para el virus.

#### 1.4. Estructura del genoma y expresión génica

El genoma de los CoVs consiste en una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva con un tamaño que varía entre 28 y 30 kb (de Groot, R. J., y col., 2012;Enjuanes, L., y col., 2008;Gorbalenya, A. E., y col., 2006;Snijder, E. J., y col., 2003). Este tamaño de genoma RNA es de los más grandes que se conocen, teniendo en cuenta que recientemente se ha identificado un nidovirus de la familia *Mononiviridae* que posee un genoma de 41 kb (Saberri, A., y col., 2018). Estructuralmente, el gRNA viral se asemeja a los mRNAs eucariotas

celulares, dado que posee una estructura cap (7-metilguanosina 2-O-metilribosa) en el extremo 5', una cola de poli-A en el extremo 3', y regiones no traducidas en ambos extremos (5' UTR y 3'UTR) (Brian, D. A. y Baric, R. S., 2005; Jacobs, L., y col., 1986; Page, K. W., y col., 1990).

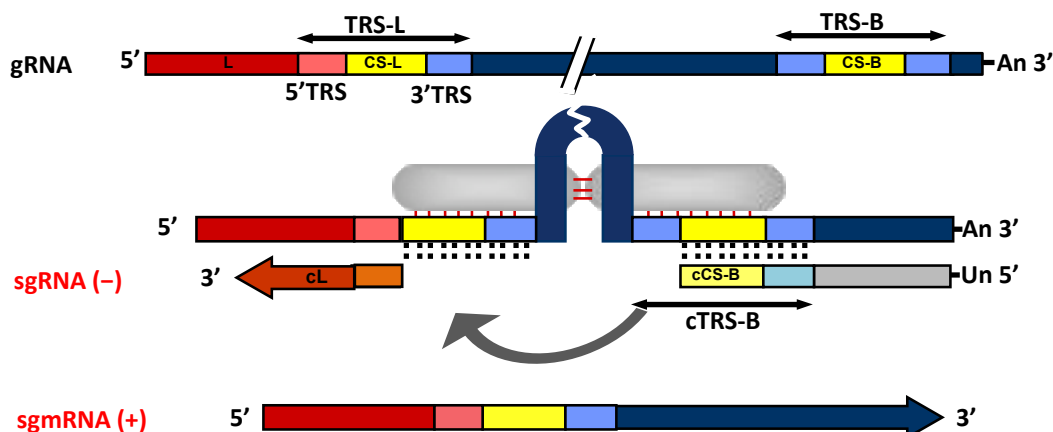
La organización básica del genoma es común a todos los miembros del orden *Nidovirales* (Fig. 3B). Los dos tercios 5' terminales codifican la replicasa viral, constituida por dos fases abiertas de lectura (ORFs) solapantes, ORF1a y ORF1b, que se traducen directamente a partir del RNA genómico al comienzo de la infección, dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1ab (Thiel, V., y col., 2003). Ambas poliproteínas son co-amino terminales, dado que la pp1ab se traduce mediante un salto de fase del ribosoma que tiene lugar en la región de solapamiento de las dos ORFs y permite evitar el codón de terminación de la ORF1a (Brierley, I., y col., 1989). Estas poliproteínas se autoproteolizan para dar lugar a 16 proteínas no estructurales (nsps) (Ziebuhr, J., 2005). Las nsps incluyen las actividades necesarias para la replicación viral, tales como proteasa (en nsp3 y nsp5), RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp, en nsp12), primasa (en nsp8), o helicasa (en nsp13). Además codifican actividades de metabolismo del RNA que son poco frecuentes en los genomas virales, tales como exoribonucleasa (ExoN, nsp14); endoribonucleasa (NendoU, nsp15), actividades implicadas en la síntesis del 5'cap como RNA trifosfatasa (RTPasa, nsp13), guanililtransferasa (GTasa, nsp12), N7-metiltransferasa (N7-MTasa, nsp14) o 2'-O-ribosa-metiltransferasa (2O-MTasa, nsp16) (Neuman, B. W., y col., 2014; Posthuma, C. C., y col., 2017; Sevajol, M., y col., 2014; Smith, E. C., y col., 2014; Subissi, L., y col., 2014). Muchas de las nsps de CoVs también modulan la interacción con el hospedador, antagonizando la respuesta antiviral (Baez-Santos, Y. M., y col., 2015; Becares, M., y col., 2016; Deng, X., y col., 2017; Deng, X., y col., 2019; Fehr, A. R., y col., 2016; Frieman, M., y col., 2009; Jauregui, A. R., y col., 2013; Kindler, E., y col., 2017; Narayanan, K., y col., 2015; Shi, P., y col., 2019; Zhang, Q., y col., 2018; Zhang, Q., y col., 2017; Zhu, X., y col., 2017; Zuñiga, S., y col., 2016; Zust, R., y col., 2011; Zust, R., y col., 2007).

El tercio 3' terminal del genoma contiene los genes estructurales en el orden 5'-S-E-M-N-3', y los genes específicos de género, cuyo número, posición y secuencia varía dependiendo de la especie de CoV (de Groot, R. J., y col., 2012; Masters, P. S., 2006). En el caso del virus de la diarrea epidémica porcina

(PEDV), su genoma contiene un gen específico de género, la ORF3, localizado entre las proteínas S y E (Fig. 3B). La proteína 3 no es esencial para la replicación en cultivos celulares e in vivo, y su eliminación no afecta a la virulencia del virus (Beall, A., y col., 2016;Curtis, K. M., y col., 2004;Sola, I., y col., 2003). Se ha descrito que la proteína 3 se localiza en el Golgi (Kaewborisuth, C., y col., 2018;Kaewborisuth, C., y col., 2019) y tiene actividad canal iónico, al igual que otras proteínas homólogas en distintas especies de CoVs (Wang, K., y col., 2012). Se conoce poco de su papel en el contexto de la infección, dado que en cultivos celulares tiende a eliminarse y parece que dificulta la replicación viral (Jengarn, J., y col., 2015;Wongthida, P., y col., 2017).

Todos los genes del tercio 3' terminal del genoma se expresan a partir de una colección de sgRNAs de distintos tamaños, coterminales en sus extremos 5' y 3'. Los sgRNAs son estructuralmente policistrónicos pero funcionalmente monocistrónicos dado que, por lo general, únicamente se traduce la ORF más cercana al extremo 5' (Fig. 3B) (Masters, P. S., 2006). Estos sgRNAs presentan en su extremo 5' una secuencia líder, de 72 nucleótidos en el caso del PEDV, que también se encuentra en el extremo 5' del gRNA. Esta secuencia se incorpora a los sgRNAs mediante un proceso de transcripción discontinua dirigido por las secuencias reguladoras de la transcripción (TRSs) formadas por un hexanucleótido central conservado (CS), que se repite también en el extremo 3' del líder, flanqueado por secuencias de longitud variable denominadas 5' y 3' TRS (Fig. 4) (Enjuanes, L., y col., 2006;Sawicki, S. G., y col., 2007;Sola, I., y col., 2005;Zuniga, S., y col., 2004). El proceso de transcripción se inicia copiando el extremo 3' del genoma hasta alcanzar las TRSs localizadas en el extremo 5' de cada gen (TRS-B), que actuarían como señales de parada para la polimerasa viral. En este punto, se produce un cambio de molde, con la hibridación de la secuencia complementaria a la TRS-B (cTRS-B) de la cadena negativa naciente con la TRS del líder (TRS-L), de modo que se copia la secuencia del líder, generándose los sgRNAs de polaridad negativa (Fig. 4). Éstos actúan de molde para la síntesis de los sgRNAs de polaridad positiva (Enjuanes, L., y col., 2007;Sola, I., y col., 2015). El proceso de cambio de molde está controlado por varios factores, como la complementariedad entre la TRS-L y la cTRS-B o interacciones RNA-RNA que permiten la aproximación en el espacio de regiones

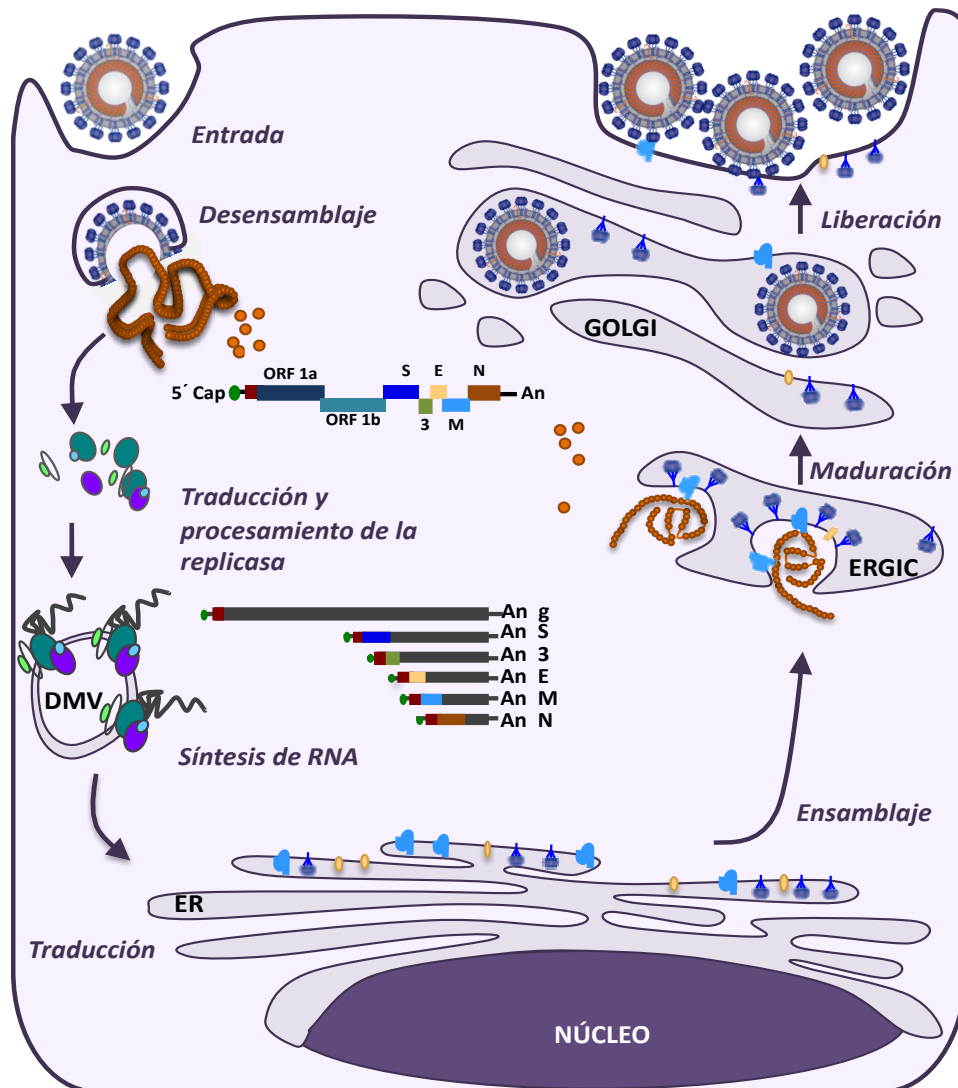
distales del genoma (Mateos-Gomez, P. A., y col., 2013; Mateos-Gomez, P. A., y col., 2011; Sola, I., y col., 2015; Sola, I., y col., 2011).



**Figura 4. Modelo de transcripción en CoVs.** El RNA genómico codificante de polaridad positiva (gRNA) se muestra como una línea azul, en la que se indican la secuencia líder (L, rojo) y las TRS del líder (TRS-L) y de los genes (TRS-B), destacando en cada caso la secuencia central conservada (CS-L y CS-B, en amarillo). El RNA de polaridad negativa se representa como una línea gris, donde se indican la secuencia complementaria al líder (cL, naranja oscuro) y la secuencia complementaria a la TRS de los genes (cTRS-B), destacándose la secuencia complementaria a la CS de los genes (cCS-B). Interacciones RNA-RNA y RNA-proteína (representadas por el plegamiento del gRNA, y óvalos grises, respectivamente) controlan el cambio de molde (flecha gris).

## 1.5. Ciclo infectivo

El ciclo infectivo de los CoVs (Fig. 5) tiene lugar en el citoplasma de la célula infectada y comienza con la unión de la proteína S de la superficie del virión al receptor celular, lo que desencadena la endocitosis del virus. La naturaleza del receptor celular para PEDV es aún asunto de controversia. Se ha propuesto que la aminopeptidasa porcina (pAPN) es el receptor celular (Li, B. X., y col., 2007), y varios resultados experimentales apoyan esta propuesta (Deng, F., y col., 2016; Kamau, A. N., y col., 2017; Liu, C., y col., 2015; Oh, J. S., y col., 2003). Sin embargo, otros estudios proponen que la pAPN no es el receptor para PEDV, y que es la unión a ácidos siálicos lo que facilita la entrada en la célula hospedadora (Li, F., 2016; Li, L., y col., 2017; Shirato, K., y col., 2016). In vivo se ha descrito que lechones que no expresan la pAPN son susceptibles a la infección con PEDV (Andreazza, S., y col., 2019) y por otro lado, lechones deficientes en la producción de ácido siálico también son susceptibles a la infección por PEDV (Tu, C. F., y col., 2019).



**Figura 5. Ciclo infeccioso de los CoVs.** Esquema de la infección por CoVs, tomando como modelo el PEDV, en el que se muestran las diferentes fases del ciclo infeccioso. Se representan las especies de RNA codificantes, de polaridad positiva. An, poliA; DMV, vesícula de doble membrana; ER, retículo endoplásmico; ERGIC, compartimento intermedio; GOLGI, aparato de Golgi.

Después de la unión al receptor, la membrana viral se fusiona con la membrana del endosoma y se produce el desensamblaje del virión y la liberación del genoma viral al citoplasma, donde es traducido dando lugar a las poliproteínas pp1a y pp1ab (Lai, M. M. C. y Cavanagh, D., 1997; Perlman, S. y Netland, J., 2009). Éstas se autoprocetan proteolíticamente, generándose las 16 nsps que, junto con la proteína N y proteínas celulares, forman el complejo de replicación-transcripción (RTC). El RTC se ensambla en vesículas de doble membrana (DMVs) originadas a partir del retículo endoplásmico celular (ER)



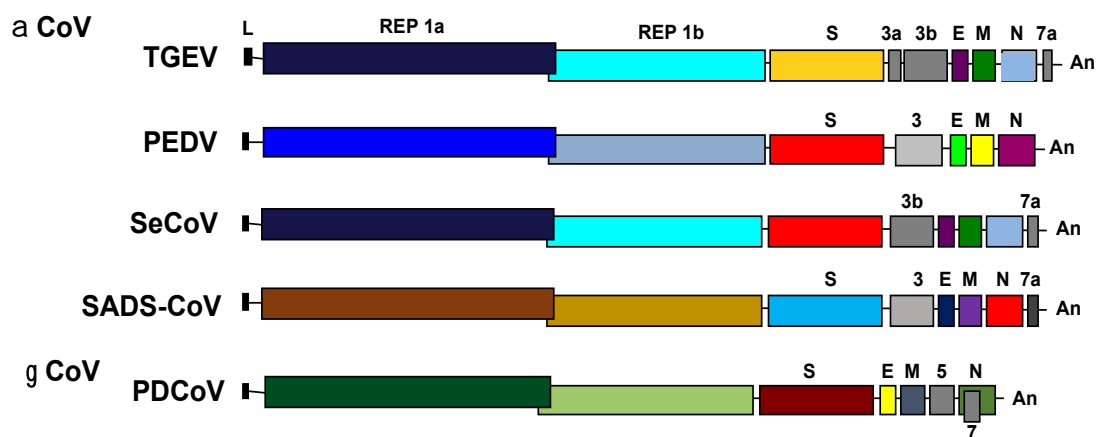
(Knoops, K., y col., 2008). Este complejo lleva a cabo la replicación del genoma viral y la transcripción de los sgmRNAs (Enjuanes, L., y col., 2006; Pasternak, A. O., y col., 2006; Sawicki, S. G. y Sawicki, D. L., 1990; Sawicki, S. G., y col., 2007; Smith, E. C., y col., 2014; Sola, I., y col., 2015). A partir de los sgmRNAs se traducen las proteínas virales estructurales y accesorias. Las proteínas S, M y E se integran en la membrana del ER y se translocan a las cisternas del compartimento intermedio (ERGIC) (Stertz, S., y col., 2007; Tooze, J., y col., 1984). Paralelamente, la proteína N se asocia con los nuevos genomas progenie formando las nucleocápsidas helicoidales. Éstas se incorporan en las partículas virales a través de la interacción entre la proteína N y el dominio C-terminal de la proteína M, que conduce a la invaginación de la membrana del ERGIC alrededor de las nucleocápsidas, dando lugar a los viriones inmaduros (Narayanan, K. y Makino, S., 2001; Sturman, L. S., y col., 1980). Los viriones progenie son transportados por las cisternas del aparato de Golgi, produciéndose su maduración conforme progresan a través de la ruta secretora (Salanueva, I. J., y col., 1999). Finalmente, la progenie viral se libera al medio extracelular mediante la fusión con la membrana plasmática de las vesículas que contienen los viriones (Tooze, J., y col., 1987).

## 2. CORONAVIRUS ENTÉRICOS PORCINOS

### 2.1. Enfermedades causadas por coronavirus entéricos porcinos

Actualmente se conocen seis especies de CoVs porcinos, cinco de ellas con tropismo entérico (Fig. 6). Estos CoVs porcinos entéricos causan lo que se ha denominado SECD (por las siglas en inglés de *swine enteric coronavirus disease*) (Niederwerder, M. C. y Hesse, R. A., 2018; Wang, H., y col., 2019). Los CoVs entéricos porcinos infectan principalmente los enterocitos del intestino delgado, causando una necrosis aguda que provoca la atrofia de las vellosidades intestinales (Chattha, K. S., y col., 2015; Jung, K. y Saif, L. J., 2015; Wang, H., y col., 2019; Zuñiga, S., y col., 2016). Esto produce una diarrea severa como consecuencia de una mala absorción de nutrientes. A menudo, la diarrea se acompaña de vómitos, deshidratación severa y pérdida de apetito, lo que puede causar la muerte de los animales infectados. La severidad de la SECD es dependiente de la edad de los animales, siendo superior en lechones menores de dos semanas con una mortalidad que puede llegar al 95-100%. En animales

de más edad y en cerdas gestantes, la infección causa síntomas leves que desaparecen en 5-10 días (Jung, K. y Saif, L. J., 2015). Los brotes de SECD causan enormes pérdidas económicas a nivel mundial, especialmente en Asia o en EE.UU en 2013, dado que, aunque los animales se recuperen de la infección, se produce un retraso en su crecimiento (Kim, L., y col., 2000; Lawhorne, L. W., 1999). Aunque los síntomas clínicos son idénticos independientemente del CoV que cause la SECD, los virus son antigénicamente distintos y no existe protección cruzada (Gimenez-Lirola, L. G., y col., 2017; Lin, C. M., y col., 2015).



**Figura 6. CoVs entéricos porcinos.** En la figura se representan los CoVs que causan SECD y que se describen en los apartados siguientes.  $\alpha$ CoV, género *Alphacoronavirus*;  $\gamma$ CoV, género *Gammacoronavirus*. L, líder; An, cola poli-A. Los nombres de las proteínas virales se indican encima de las cajas de colores.

## 2.2. Clasificación y epidemiología

Los cinco CoVs porcinos entéricos se clasifican en los géneros *Alphacoronavirus*: TGEV, PEDV, coronavirus entérico porcino (SeCoV) y coronavirus del síndrome de la diarrea aguda porcina (SADS-CoV) y *Deltacoronavirus*: deltacoronavirus porcino (PDCoV) (Fig.6). El PEDV, objeto de esta tesis, se describe en detalle en el apartado 3 de esta sección.

El TGEV produce una enteritis muy contagiosa en cerdos recién nacidos, con índices de mortalidad del 80-100% (Kim, L., y col., 2000). A diferencia del resto de los CoVs entéricos porcinos, posee tropismo tanto entérico como respiratorio. La infección por este virus se describió por primera vez en EE.UU. (Doyle, L. P. y Hutchings, L. M., 1946), y se ha identificado en la mayoría de los países europeos, así como América Central y del Sur, Canadá y en diversos países

asiáticos (Zhang, X., y col., 2007). Actualmente, la mayor parte del ganado porcino europeo o en EE.UU. presenta inmunidad parcial frente al TGEV debido a la diseminación de un mutante natural atenuado, el coronavirus respiratorio porcino (PRCV), que no produce síntomas clínicos relevantes (Enjuanes, L. y Van der Zeijst, B. A. M., 1995; Pensaert, M. y Van Reeth, K., 1998; Wesley, R. D., y col., 1991). Sin embargo, la enfermedad continúa causando graves problemas económicos para los productores del ganado porcino, particularmente en granjas seronegativas de EE.UU., América Central, Rusia y China (OIE; Woods, R. D. y Wesley, R. D., 1998).

La circulación en Europa durante años tanto del TGEV como del PEDV, ha favorecido la aparición del SeCoV, que es un recombinante entre ambos, con un genoma similar al TGEV expresando la S del PEDV (Fig. 6). Este virus se identificó por primera vez en Italia, donde se estima que lleva circulando desde 2009 (Boniotti, M. B., y col., 2016). Posteriormente, se ha identificado también en Alemania y en distintas zonas de Europa central (Akimkin, V., y col., 2016; Belsham, G. J., y col., 2016; Mandelik, R., y col., 2018). Cabe destacar que el SeCoV continúa circulando en Europa, lo que dificulta el diagnóstico de los brotes de SECD. Además, siguen ocurriendo eventos de recombinación entre los virus circulantes, subrayando el peligro de la ausencia de medidas profilácticas adecuadas, como por ejemplo vacunas. Recientemente se ha descrito en Italia un recombinante entre PEDV y SeCoV que en 2017 se impuso y terminó con la epidemia de PEDV que había comenzado en 2015 (Boniotti, M. B., y col., 2018).

El PDCoV se identificó por primera vez en Hong Kong en 2009 (Woo, P. C., y col., 2012), aunque fue con su emergencia en EE.UU. en 2014 cuando se empezó a estudiar su relevancia en la SECD (Wang, L., y col., 2014; Zhang, Q. y Yoo, D., 2016). Estudios retrospectivos han revelado que probablemente el PDCoV circulaba en EE.UU. desde 2010 (Thachil, A., y col., 2015). El virus se ha detectado posteriormente en otros lugares de China, en Canadá, Tailandia, Corea y Japón (Janetanakit, T., y col., 2016; Lee, J. y Storch, G. A., 2014; Marthaler, D., y col., 2014; Song, D., y col., 2015b; Suzuki, T., y col., 2017). El PDCoV causa una patología menos severa que otros CoVs entéricos porcinos, con una tasa de mortalidad de alrededor del 40% establecida en condiciones experimentales, dado que en el campo frecuentemente se producen

co-infecciones de PDCoV y PEDV (Niederwerder, M. C. y Hesse, R. A., 2018; Wang, Q., y col., 2019). Actualmente existe preocupación por el potencial zoonótico del PDCoV, dado que el virus se une no solo a la pAPN que es el receptor natural, sino también a la APN humana, felina y aviar (Li, W., y col., 2018), y tanto las especies bovina como aviar son susceptibles al PDCoV en infecciones experimentales (Jung, K. y Saif, L. J., 2017; Shi, P., y col., 2019).

Por último, recientemente se ha identificado el SADS-CoV en China, causante de brotes graves en varias granjas, con una tasa de mortalidad de hasta el 95% (Fu, X., y col., 2018; Gong, L., y col., 2017; Pan, Y., y col., 2017; Zhou, P., y col., 2018). Se ha descrito que los murciélagos son el reservorio natural del SADS-CoV, y que brotes en granjas han ocurrido por eventos independientes de transmisión del virus desde murciélago a cerdo (Zhou, P., y col., 2018). Recientemente, un estudio retrospectivo determinó que el SADS-CoV circula en las granjas de cerdos en China desde agosto de 2016 (Zhou, Y., y col., 2019).

### **3. PEDV**

#### **3.1. Evolución y clasificación**

El virus PEDV, modelo de estudio de esta tesis, pertenece al género *Alphacoronavirus*, subgénero *Pedacovirus* y produce una enteritis muy contagiosa en cerdos recién nacidos, con índices de mortalidad cercanos al 100% (Jung, K. y Saif, L. J., 2015). La enfermedad fue descrita por primera vez en 1971 en Reino Unido (Wood, E. N., 1977) y el agente etiológico causante de la misma fue identificado en Bélgica como un nuevo coronavirus, designado como PEDV (Pensaert, M. B. y De Bouck, P., 1978). Posteriormente, el virus se extendió por la mayoría de países europeos y Asia (Liu, Y. V., y col., 2011). En 2010, emergieron en Asia nuevas cepas virulentas (Ayudhya, S. N., y col., 2012), que se extendieron a los Estados Unidos en 2013, donde hasta ese momento nunca había circulado el PEDV (Niederwerder, M. C. y Hesse, R. A., 2018; Scott, A., y col., 2016). En ausencia de pre-inmunidad, el virus se extendió rápidamente, afectando a todos los estados productores de ganado porcino, y causando graves pérdidas económicas (Schulz, L. L. y Tonsor, G. T., 2015). Posteriormente, el virus se extendió a Canadá, México y otros países del continente americano (Wang, L., y col., 2014).

Las cepas clásicas de PEDV se han clasificado en el genogrupo G1, mientras que las nuevas cepas virulentas se clasifican en el genogrupo G2 (Wang, X., y col., 2016). Dentro del G2, se observó la aparición de cepas de virulencia moderada, que contenían pequeñas deleciones e inserciones en el gen de la S (S-INDEL) (Vlasova, A. N., y col., 2014). Más tarde, este tipo de cepas de PEDV fueron también detectadas en Alemania, Francia, Bélgica, Italia, Austria y España (Choudhury, B., y col., 2016; Gallien, S., y col., 2018; Pensaert, M. B. y Martelli, P., 2016; Stadler, J., y col., 2015). Solo en Ucrania se han detectado cepas virulentas no S-INDEL, similares a las virulentas del origen epidémico en EE.UU. y que circulan en Asia (Dastjerdi, A., y col., 2015). Cabe destacar que las nuevas cepas virulentas PEDV han emergido en zonas donde se han usado las vacunas existentes contra PEDV. Esto indica que las vacunas no son efectivas y es necesario el desarrollo de nuevas vacunas efectivas y bioseguras.

### **3.2. Respuesta inmune y protección frente a PEDV**

Al igual que el resto de CoVs entéricos porcinos, el PEDV infecta fundamentalmente las células del epitelio intestinal. Éstas son el principal componente de la barrera del epitelio intestinal, que separa el sistema inmune en mucosas de la microbiota del lumen del intestino (Zhang, Q. y Yoo, D., 2016). Esta barrera también está compuesta por células de Paneth y células caliciformes que secretan moco y proteínas antimicrobianas. Se ha descrito que la infección por PEDV reduce el número de células caliciformes, lo cual probablemente disminuye la capa de moco, contribuyendo a la alteración de la barrera intestinal (Curry, S. M., y col., 2018; Jung, K. y Saif, L. J., 2017). El entorno inmunitario en el intestino es complejo, con la presencia de linfocitos intraepiteliales y de linfocitos B, T, células dendríticas (DCs) y macrófagos en la lámina propia. Además, en cerdo, el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) es crucial para la inmunidad local en el intestino y para la inducción de respuestas inmunes sistémicas (Chattha, K. S., y col., 2015). La infección con PEDV, y otros CoVs entéricos, induce IgA e IgG plasmablastos en el GALT. Los plasmablastos IgA se movilizan a la lámina propia y a la glándula mamaria, donde maduran para convertirse en células secretoras de IgAs (ASCs). Este fenómeno se conoce como el eje intestino-glándula mamaria y es fundamental para comprender la inmunidad frente a PEDV (Chattha, K. S., y col.,

2015;Langel, S. N., y col., 2016). Las IgAs secretadas (slgAs) específicas para PEDV y neutralizantes son transmitidas en el calostro y la leche de las madres, induciendo inmunidad lactogénica en los lechones recién nacidos (Langel, S. N., y col., 2016;Song, Q., y col., 2016). Por este motivo, se ha demostrado que la inmunización por vía oral es más efectiva para la protección frente a PEDV, induciendo una inmunidad tanto lactogénica como sistémica más duradera (Chattha, K. S., y col., 2015;Langel, S. N., y col., 2016).

La respuesta inmune innata es fundamental para contrarrestar las infecciones virales. En el caso del intestino, el IFN de tipo III es uno de los principales mediadores de la inmunidad innata (Pott, J., y col., 2011;Zhang, Q.y Yoo, D., 2016). Se conoce poco del papel de la inmunidad innata en la patogénesis de PEDV. Al igual que otros CoVs virulentos, el PEDV inhibe la producción de IFN en cultivos celulares (Cao, L., y col., 2015a;Zhang, Q., y col., 2016). Por otro lado, la infección con PEDV activa la producción de IFN tipo I por DCs, lo que correlaciona con la inducción de IFN que se observa in vivo (Annamalai, T., y col., 2015;Wang, X., y col., 2017). PEDV induce la activación de la ruta NF- $\kappa$ B (Cao, L., y col., 2015a;Guo, X., y col., 2016). De hecho, se ha descrito que, en cultivos celulares, las cepas virulentas de PEDV inducen un aumento en la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de citoquinas pro-inflamatorias en comparación con una cepa atenuada vacunal (Guo, X., y col., 2016). Varias proteínas virales se han relacionado con la modulación de estas respuestas: la proteína nsp1 (Zhang, Q., y col., 2018;Zhang, Q., y col., 2017;Zhang, Q.y Yoo, D., 2016), la proteína nsp15 con actividad EndoU (Deng, X., y col., 2019), la proteína nsp16 (Shi, P., y col., 2019) y la proteína N (Ding, Z., y col., 2014;Shan, Y., y col., 2018).

### **3.3. Vacunas frente a PEDV**

Debido a la amplia expansión de PEDV en el continente europeo y asiático se desarrollaron diferentes tipos de vacunas. En Asia se han usado extensivamente tanto vacunas inactivadas como atenuadas, que no han impedido la aparición de las cepas virulentas que circulan actualmente. En EE.UU. se licenciaron condicionalmente dos vacunas, aunque aún se está estudiando su eficacia. La primera fue desarrollada por Harris Vaccines Inc. y está basada en la expresión de la proteína S de PEDV usando un replicon de la encefalitis equina venezolana

(VEEV) (Crawford, K., y col., 2016). La segunda fue desarrollada por Zoetis, como una vacuna inactivada de una cepa virulenta de PEDV (Opriessnig, T., y col., 2017a). Para que una vacuna sea efectiva frente a la infección por PEDV, es necesario que induzca inmunidad en mucosas y la producción de anticuerpos neutralizantes, especialmente IgAs (Oszvald, M., y col., 2007). A continuación se revisan los diferentes tipos de vacunas que se están desarrollando frente a PEDV.

### *3.1.1. Vacunas de subunidades*

Las vacunas de subunidades consisten en la formulación de antígenos virales para estimular la respuesta inmune. La ventaja de este tipo de vacunas es su especificidad, estabilidad, bioseguridad y su bajo coste (Oh, T., y col., 2019; Yu, Q., y col., 2017). Sin embargo, las respuestas inmunes que inducen son de corta duración. Se han descrito varias vacunas de subunidades para PEDV basadas en la expresión de la proteína S o de dominios de la misma, como el reconocido por los anticuerpos neutralizantes (Li, Q., y col., 2018), o el dominio S1. Éstos se han expresado en *E. coli* (Kim, S. H., y col., 2018), con baculovirus (Chang, Y. C., y col., 2018), o en células de mamífero (Subramaniam, S., y col., 2018). Las vacunas se han formulado con los antígenos sin purificar o purificados (Makadiya, N., y col., 2016; Oh, J., y col., 2014; Wang, X., y col., 2016; Zhang, N., y col., 2016). Para que se induzcan anticuerpos neutralizantes se necesitan, por lo general, entre 2 y 3 dosis de recuerdo. Además, la respuesta inmune inducida no es protectora, dado que la infección por PEDV tras el desafío sigue causando daño entérico.

### *3.1.2. Vacunas inactivadas*

Las vacunas inactivadas consisten en el uso como antígeno del virus completo no infectivo. La infectividad se elimina mediante tratamientos químicos o cambios de temperatura. Al igual que las vacunas de subunidades, se formulan con adyuvantes y se administran por vía intramuscular, y son fáciles y rápidas de desarrollar (Baek, P. S., y col., 2016; Vanhee, M., y col., 2009). A diferencia de las vacunas de subunidades, se utiliza el virus completo como antígeno, por lo que la respuesta inmune inducida suele ser más fuerte. En el caso del PEDV, se han descrito vacunas basadas en la inactivación tanto de virus PEDV virulentos

como atenuados. Así, se han utilizado una cepa coreana atenuada por pases en cultivo (QIAP1401-70) (Lee, S. H., y col., 2018), una cepa americana que produce síntomas moderados (NPL PEDV 2013 P1Q1) (Collin, E. A., y col., 2015), la cepa coreana virulenta KNU-141112/2014 (Baek, P. S., y col., 2016), u otras cepas virulentas del genogrupo 2b (Gillespie, T., y col., 2018; Li, B., y col., 2017; Opriessnig, T., y col., 2017a). Las vacunas inactivadas tampoco establecen una protección eficaz o duradera. Estimulan la respuesta inmune dado que producen IgAs e IgGs, pero no establecen memoria inmunitaria (Crawford, K., y col., 2016; Sato, T., y col., 2011). Se ha propuesto que tanto las vacunas de subunidades como inactivadas podrían ser útiles en la protección en cerdas gestantes antes del parto (Paudel, S., y col., 2014).

### 3.1.3. Vacunas vivas

Al igual que la infección natural, inducen inmunidad en la mucosa intestinal, en respuesta a la replicación viral que se produce en el tejido, dando lugar a inmunidad lactogénica y una respuesta protectora duradera. El problema de este tipo de vacunas es la dispersión del virus vacunal, lo puede llevar a reversión al fenotipo virulento. Además, algunas inducen una respuesta inmune y protección ineficientes frente a la infección por PEDV, lo que puede producir persistencia del virus en las granjas (Crawford, K., y col., 2016).

Entre las estrategias de vacunación con el virus vivo, se encuentra la denominada *feedback*, consistente en utilizar machacado de tejido intestinal de animales infectados por PEDV y muertos. Este material, que contiene altos títulos del virus PEDV, es administrado vía oral a cerdas gestantes para su inmunización (Song, D., y col., 2015a). Debido a la rápida expansión del PEDV en EE.UU., se aconsejó esta estrategia de vacunación. Aparte de los riesgos de co-infecciones con virus como el del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) o *Salmonella*, (Ha, Y., y col., 2010; Yang, J. S., y col., 2003). Esta estrategia induce bajos niveles de inmunidad lactogénica, siendo menos efectiva para la eliminación de PEDV de una granja (Ayudhya, S. N., y col., 2012; Chattha, K. S., y col., 2015). De hecho, frecuentemente se reproducen brotes en granjas afectadas, causado por la misma cepa de PEDV (Langel, S. N., y col., 2016).

Se han desarrollado varias vacunas vivas atenuadas (MLVs) obtenidas mediante pases seriados en cultivos celulares, como gran parte de las vacunas



utilizadas en Asia, atenuando cepas de PEDV como CV777 (Sun, D., y col., 2016), DR13 (Park, S. J., y col., 2012) o 83P-5 (Sato, T., y col., 2011). En muchos casos, la replicación en el intestino se reduce drásticamente debido a la adaptación al crecimiento en cultivos celulares. Además, en Asia se identificaron cepas virulentas derivadas de las atenuadas (Li, R., y col., 2016). Recientemente se han descrito varias vacunas atenuadas basadas en cepas epidémicas de PEDV, como las cepas asiáticas QIAP401 (Yang, D. K., y col., 2018), KNN-141112 (Lee, S., y col., 2017), P-5V (Sato, T., y col., 2018), Zheijiang 08 (Li, Y., y col., 2017) o Piting 52 (Chang, Y. C., y col., 2017), o las cepas americanas 13-019349 (Goede, D., y col., 2015) o PC22A (Lin, C. M., y col., 2017). En todos los casos, las vacunas se han obtenido pasando los virus en cultivo 70-120 veces. Éstos inducen anticuerpos neutralizantes, pero no protegen frente a la infección después de un desafío con una cepa virulenta (Lin, C. M., y col., 2019). Además, la reversión a la virulencia se produce después de pocos pases in vivo.

Una estrategia que combina las ventajas de vacunas de subunidades con las MLVs es el uso de vectores virales que expresan la proteína S o dominios de la misma. Como vectores virales se han usado parapoxvirus (Hain, K. S., y col., 2016), swinepox (Yuan, X., y col., 2017) o VSV (Ke, Y., y col., 2019). Éstas inducen protección parcial frente al desafío. Aquí se encuadran los replicones de RNA, deficientes en propagación, de mayor seguridad (Kim, H., y col., 2016).

El mayor progreso en el desarrollo de MLVs bioseguras se basa en su obtención mediante ingeniería genética. Para ello se necesitan sistemas de genética reversa, e identificación de genes de virulencia con el fin de diseñar e introducir mutaciones atenuantes (Hou, Y., y col., 2019) como el caso de la cepa virulenta americana PC22A atenuada mediante mutaciones en la señal de endocitosis de la proteína S y eliminación de actividad 2'-OMTasa de la nsp16 (Hou, Y., y col., 2019). Este tipo de vacunas bioseguras, obtenidas por genética reversa, son el principal objetivo del trabajo presentado en esta tesis.

## **4. SESGO EN LOS PARES DE CODONES Y ATENUACIÓN VIRAL**

El código genético está degenerado, dado que varios codones codifican para un mismo aminoácido (codones sinónimos). Sin embargo, el uso de un codón sinónimo u otro tiene cierta preferencia en cualquier organismo. Esto lleva al sesgo en el uso de codones, que se refiere a la frecuencia con la que cada codón

sinónimo se encuentra en el DNA codificante. El sesgo es específico de especie debido, entre otros factores, a la abundancia relativa de cada tRNA y a la tasa no uniforme de lectura por el ribosoma (Hanson, G. y Coller, J., 2018). Existe además un sesgo en los pares de codones (CPB, por las siglas de *codon pair bias*) que se refiere a la frecuencia con que dos codones aparecen juntos en una secuencia codificante (Gutman, G. A. y Hatfield, G. W., 1989; Kunec, D. y Osterrieder, N., 2016). Se ha descrito que cambios en el CPB de un gen viral, mediante mutaciones silenciosas cambiando codones por otros sinónimos que ya estén presentes en la secuencia y alterando únicamente el orden en que éstos aparecen, conduce a la atenuación viral (Wimmer, E. y Paul, A. V., 2011). Esta estrategia se utilizó en la atenuación de poliovirus (Coleman, J. R., y col., 2008b) y, posteriormente, se ha usado para atenuar el virus respiratorio sincitial (RSV) (Le Nouen, C., y col., 2014), el virus de la gripe (IAV) (Le Nouen, C., y col., 2019; Mueller, S., y col., 2010a), el PRRSV (Gao, L., y col., 2015; Ni, Y. Y., y col., 2014), dengue (Shen, S. H., y col., 2015; Stauff, C. B., y col., 2018), el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Wang, B., y col., 2015), herpesvirus (Conrad, S. J., y col., 2018; Eschke, K., y col., 2018) o el Zika (ZIKV) (Li, P., y col., 2018). De hecho, el cambio en el CPB se ha propuesto como una estrategia general para desarrollar vacunas más seguras (Evenson, D., y col., 2016; Kaplan, B. S., y col., 2018; Wimmer, E. y Paul, A. V., 2011). Aunque se desconocen los mecanismos exactos de la atenuación viral al cambiar el CPB, se ha propuesto que se debe a cambios en la velocidad de traducción, a una disminución en la eficiencia de replicación del virus o a cambios en la frecuencia de los dinucleótidos CpG o UpA, que pueden afectar a la inducción de la respuesta inmune innata o a la estabilidad del mRNA, respectivamente (Kunec, D. y Osterrieder, N., 2016; Simmonds, P., y col., 2015). Las ventajas del cambio en el CPB como estrategia de atenuación se basan en: (1) en el ajuste fino que supone no cambiar la secuencia de la proteína, sino alterar el orden en el que aparecen los codones, generando cambios silenciosos; (2) que permite introducir un mayor número de mutaciones silenciosas en la secuencia, lo que da una mayor seguridad ante una posible reversión al fenotipo virulento; (3) que la ausencia de cambios en las proteínas lleva a la misma inducción de la respuesta inmune; y (4) que se puede combinar esta estrategia con otras adicionales no tan seguras, que se benefician de la dificultad de reversión del cambio en el CPB.

## ***OBJETIVOS***

Los CoVs entéricos porcinos son patógenos emergentes que causan un gran número de brotes por todo el mundo y, en consecuencia, grandes pérdidas económicas. Las vacunas vivas atenuadas son las más eficaces para proteger frente a estos virus. El trabajo de esta tesis se ha centrado en uno de estos CoVs porcinos, el PEDV. Actualmente no existen vacunas efectivas para las nuevas cepas epidémicas virulentas de PEDV. Ello se debe, en parte, a que se desconocen las bases moleculares de la virulencia de PEDV. En este sentido, el objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de un candidato a vacuna viva atenuada que estimule la respuesta inmune del hospedador y proteja frente a la infección por PEDV. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Generación de un candidato a vacuna para PEDV basado en un virus quimérico atenuado TGEV-PEDV
2. Obtención de un clon infectivo para una cepa epidémica virulenta de PEDV
3. Generación de virus sintéticos con modificaciones en el sesgo en los pares de codones (CPB) del gen de la proteína N y caracterización de su virulencia
4. Diseño y obtención de posibles candidatos a vacuna que contengan modificaciones en el CPB del gen N y medidas de atenuación adicionales

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## **1. MANEJO DE CÉLULAS**

### **1.1. Líneas celulares**

La línea celular Vero originada a partir de riñón de mono (*Cercopithecus aethiops*) fue cedida al laboratorio por el Dr. Zoltan Penzes (Ceva Santé Animale, S.A.). La línea celular epitelial ST (McClurkin, A. W. y Norman, J. O., 1966), derivada de testículo embrionario de cerdo, fue cedida al laboratorio por el Dr. L. Kemeney (National Animal Disease Center, Ames, Iowa, EE.UU.). Las líneas celulares epiteliales BHK-21, derivada de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*), y BHK-pAPN (Delmas, B., y col., 1992), derivada de la anterior y transformada establemente con el gen que codifica la aminopeptidasa N porcina (pAPN), fueron cedidas al laboratorio por el Dr. H. Laude (Unité de Virologie Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, Francia).

### **1.2. Cultivo de líneas celulares eucariotas**

Las líneas celulares Vero, ST, BHK y BHK-pAPN fueron crecidas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con una humedad del 97%, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado con 100 UI/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino (FBS) descomplementado al 10%. En el caso de las células BHK-pAPN, cada cuatro pases, se añadió geneticina (G418) (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1.5 mg/ml en el medio de cultivo. Todas las líneas celulares fueron almacenadas mediante congelación en nitrógeno líquido a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml en dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 10% en FBS.

## **2. VIRUS**

### **2.1. Aislados virales**

Los virus recombinantes rescatados a partir de la transfección del clon infectivo del PEDV (rPEDV) presentan el fondo genético del aislado del PEDV USA/Iowa/18984/2013 (GenBank KF804028) (Hoang, H., y col., 2013). Los virus recombinantes rescatados a partir de la transfección del clon infectivo del TGEV (rTGEV) presentan el fondo genético del TGEV PUR46-MAD con la excepción del gen S, derivado del aislado C11 (Almazan, F., y col., 2000). El aislado PEDV-NVSL, usado como control positivo, es la cepa de PEDV 13-019349 (GenBank

KF267450) procedente de *National Veterinary Services Laboratory* (NVSL, USDA, EE.UU.) y que fue cedida por el Dr. Wei Lu (Ceva Animal Health, EE.UU.).

## **2.2. Crecimiento y titulación de virus en cultivos celulares**

Los virus TGEV se crecieron y titularon en células ST siguiendo protocolos descritos previamente (Correa, I., y col., 1988). Los virus recombinantes rTGEVs expresando la S del PEDV y rPEDVs se crecieron en células Vero siguiendo protocolos estándar. Brevemente, las células Vero se crecieron hasta un 100% de confluencia. Cada placa a infectar se lavó con tampón fosfato salino (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM) y, posteriormente, con medio de infección [DMEM suplementado con 0.3% medio triptosa fosfato (Sigma), 0.02% extracto de levadura (Sigma), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 100 UI/ml gentamicina (Sigma-Aldrich)]. La infección con los virus se realizó en medio de infección con 5 µg/ml de tripsina. Diariamente se añadió un 80% de tripsina al medio. Para la generación de lotes de virus, monocapas de células Vero se crecieron hasta el 100% de confluencia y se infectaron a una multiplicidad de infección (moi) de 0.1 TCID<sub>50</sub>/célula. El sobrenadante de esta infección se recogió entre 24 y 30 horas después de la infección (hpi) y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Los virus se titularon mediante dilución límite (Hofmann, M. y Wyler, R., 1988). Las células Vero fueron crecidas en placas de 96 pocillos hasta el 100% de confluencia. Se infectaron con diluciones de orden 10 de los virus, siguiendo el protocolo de infección anteriormente descrito. A las 72 hpi, la placa se fijó con formaldehído al 10% en PBS durante 20 minutos y después se tiñó con cristal violeta (0.1 % de cristal violeta, 20% metanol en agua) durante 30 minutos. El título (TCID<sub>50</sub>/ml) se calculó teniendo en cuenta la dilución en la que se obtuvo un 50% de efecto citopático.

## **2.3. Purificación parcial de los virus TGEV y PEDV**

Los sobrenadantes de células Vero infectadas con el PEDV y de las células ST infectadas con TGEV se recogieron al alcanzar un efecto citopático del 80%, y se clarificaron por centrifugación a 6000 xg durante 20 min a 4°C. Para la purificación, el sobrenadante clarificado se sedimentó por ultracentrifugación a 112000 xg durante 2 h a 4°C a través de un colchón de sacarosa al 20% en

tampón TEN (10 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) suplementado con Tween al 0.2%. El sedimento que contenía los viriones se resuspendió en tampón TNE (10 mM Tris-HCl pH7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) suplementado con Tween al 0.2%. y se sedimentó por ultracentrifugación a 112000 xg durante 1 h a 4°C. Este sedimento final se resuspendió por incubación en TNE durante 16 h a 4°C. La solución que contenía los viriones purificados se inactivó mediante luz ultravioleta (UV). La concentración de proteína se determinó utilizando el reactivo *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los virus parcialmente purificados se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### 3. BACTERIAS

#### 3.1. Cepas y cultivos de bacterias

La cepa DH10B de *Escherichia coli* (Gibco), cuyo genotipo es F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Delta$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 deoR recA1 endA1 araD139  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK l-rpsL nupG*, se utilizó rutinariamente para la clonación y amplificación de plásmidos.*

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook, J.y Russell, D. W., 2001) a 30°C o a 37°C, según se indique. El medio sólido se preparó añadiendo al LB agar a una concentración de 15 g/l y se utilizó para el aislamiento de colonias bacterianas. El medio se suplementó con los antibióticos adecuados [150 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich), 12.5 µg/ml de cloranfenicol o 100 µg/ml de kanamicina (Sigma-Aldrich)] cuando fue necesario.

#### 3.2. Preparación de bacterias competentes

Las bacterias DH10B competentes para electroporación se prepararon partiendo de una colonia única crecida en medio sólido, la cual se inoculó en dos litros de medio *Super Optimal Broth* (SOB) [20 g/l triptona (Becton, Dickinson and Company), 5 g/l extracto de levadura (Becton, Dickinson and Company), 0.5 g/l NaCl (Sigma-Aldrich), 0.18 g/l KCl (Sigma-Aldrich)] y se creció a 37°C hasta alcanzar una absorbancia a una longitud de onda de 550 nm (A550) de 0.7. A continuación, el cultivo se enfrió a 4°C durante 20 min, las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 4000 xg durante 15 min, y se lavaron tres veces con una solución de glicerol al 10% a 4°C, utilizando un volumen



equivalente al del cultivo inicial en el primer lavado, que se fue reduciendo a la mitad en los sucesivos lavados (2 l, 1 l, 0.5 l, y 0.25 l, respectivamente). En cada lavado, las bacterias se resuspendieron a 4°C y se sedimentaron a 4000 xg durante 15 min. El sedimento final se resuspendió en 6 ml de glicerol al 10% a 4°C y se repartió en alícuotas que se congelaron a -80°C hasta su utilización.

### **3.3. Transformación de bacterias mediante electroporación**

Las bacterias DH10B competentes se transformaron mediante electroporación con el DNA de interés libre de sales. Para ello, cuando fue necesario, el DNA se dializó con membranas hidrófilas de ésteres de celulosa de un tamaño de poro de 0.025 µm (Millipore). El DNA dializado se mezcló con 50 µl de bacterias competentes. La mezcla DNA-bacterias competentes se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad) donde se aplicó un pulso eléctrico de 25 µF, 2.5 KV y 200 Ω utilizando un electroporador *GenePulser* (Bio-Rad). Inmediatamente, las bacterias se resuspendieron en 1 ml de medio LB, se incubaron a 37°C con agitación durante 45 min y se sembraron por extensión en superficie sobre placas de medio LB-agar con el antibiótico de selección adecuado.

## **4. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA**

### **4.1. Plásmidos**

Los plásmidos pBlueScript II SK(-) (Stratagene), pMA-T (GeneArt), pET-28b (+) (BioBasic) y pUC57 (BioBasic) de alto número de copia, se utilizaron para la clonación y modificación de cDNAs virales de hasta 9 Kb.

El plásmido pBeloBAC11 (pBAC) (Wang, K., y col., 1997), de 5 Kbp, contiene el origen de replicación del factor F de *E. coli* (*oriS*), el gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y los genes necesarios para mantener una copia única del plásmido por célula (*parA*, *parB*, *parC* y *repE*). Este vector fue utilizado para la clonación y modificación de cDNAs virales de gran tamaño o que contuviesen secuencias tóxicas para su crecimiento en bacterias según lo descrito anteriormente (Almazan, F., y col., 2000; Gonzalez, J. M., y col., 2002).

### **4.2. Manipulación y purificación de plásmidos**

Para la purificación de plásmidos de alto número de copia a partir de cultivos de bacterias a pequeña o mediana escala se utilizaron los reactivos *Plasmid Mini Kit* o *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la purificación a gran escala de plásmidos de bajo número de copia (pBACs) se empleó el reactivo *Large Construct Kit* (QIAGEN). En este caso se partió de 500 ml del cultivo bacteriano crecido a 30°C en medio LB suplementado con 12.5 µg/ml de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) durante 18 h aproximadamente, partiendo de un preinóculo de 10 ml de cultivo.

#### **4.3. Enzimas de restricción y modificación de DNA**

Las enzimas de restricción y modificación de DNA (DNA ligasa del fago T4) se adquirieron de Roche o New England Biolabs. La fosfatasa alcalina de gamba se adquirió de Thermo Fisher Scientific. Los tratamientos enzimáticos de restricción, desfosforilación o ligación de DNA se realizaron siguiendo protocolos estándar (Sambrook, J. y Russell, D. W., 2001) y las indicaciones de los proveedores. Todas las construcciones generadas se confirmaron mediante secuenciación en la empresa MacroGen (Seúl, Korea).

#### **4.4. Amplificación del DNA mediante PCR**

Las reacciones de PCR con fines analíticos se realizaron utilizando la enzima *AmpliTaq DNA polymerase* (Applied Biosystems). En el caso de las reacciones de PCR con fines preparativos se empleó la enzima *Vent polymerase* (New England Biolabs) que posee actividad exonucleasa 3'-5' correctora de errores y, por lo tanto, mayor fidelidad. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador *SimpliAMP™* (Applied Biosystems), en un volumen final de reacción de 50 µl, utilizando 1 U de *AmpliTaq DNA polymerase* o 2.5 U de *Vent polymerase*, 10 pmoles de los oligonucleótidos correspondientes, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (Life Technologies) a una concentración final de 0.25 mM, 1.25 ó 2 mM de MgCl<sub>2</sub> para las enzimas *AmpliTaq DNA polymerase* o *Vent polymerase*, respectivamente, y entre 25 y 50 ng de DNA molde por reacción. Las condiciones de reacción se ajustaron en función de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos (T<sub>m</sub>) y la longitud del fragmento a amplificar, de la siguiente forma: (a) 94°C, 5 min; (b) 25-32 ciclos de 94°C, 1 min; (T<sub>m</sub>-10°C), 1 min; 72°C, 1 min/Kb; (c) 72°C, 10 min.

#### **4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de DNA para estudios analíticos y su purificación se realizó en geles de agarosa D-1 Bajo EEO (Pronadisa) al 0.7-1.2% en TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA) con *SYBR® Safe DNA gel stain 1x* (Invitrogen).

### **5. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS**

#### **5.1. Construcción de plásmidos para la introducción del gen de la S de PEDV en el clon infectivo de TGEV**

El plásmido pET28(+)-F3, que contenía los nucleótidos 16886 a 24745 de la cepa virulenta de PEDV USA/Iowa/18984/2013 (GeneBank KF804028), fue obtenido de BioBasic (Canadá). El plásmido pGEM-T-TGEV-SC11, que contenía los nucleótidos 20287 a 24811 del TGEV-SC11 (GenBank AJ271965) y los sitios de restricción *PacI* y *MluI* (Ortego, J., y col., 2003) se utilizó como plásmido intermedio. La secuencia que codifica el ectodominio de la S del PEDV se amplificó utilizando el plásmido pET28(+)-F3 como molde y los oligonucleótidos Pac-S-VS (5'-GGATTAATTAAGAAGGGTAAGTTGCTCATTAGAAATAATGGTAAGTTACTAACTTTGGTAACCACTTCGTTAACACACCATGAAGTCTTTAACCTAC-3', *PacI* en cursiva) y PEDV-S-3952-RS (5'-CCACACATACCAAGGCCACTTGATGTATGTCTC-3'). Por otro lado, la secuencia que codifica el dominio transmembrana y el endodominio de la S del TGEV se amplificó utilizando como molde el plásmido pGEM-T-TGEV-SC11 y los oligonucleótidos TGEV-S-4165-VS (5'-GAGACATACATCAAGTGGCCTTGGTATGTGTGG-3',) y TGEV-S-4439-RS (5'-TCCAACGCGTAAGTTTAG-3', *MluI* en cursiva). En todos los casos, las secuencias subrayadas corresponden al PEDV. Los productos obtenidos, de 4073 y 308 bp respectivamente, se usaron como moldes de la PCR solapante utilizando los oligonucleótidos Pac-S-VS y TGEV-S-4439-RS. El producto de PCR obtenido, de 4348 bp, se digirió con las enzimas de restricción *PacI* y *MluI* y se clonó en los mismos sitios del plásmido pGEM-T-TGEV-SC11, dando como resultado el plásmido pGEM-TGEV-SPEDV. Este plásmido fue digerido con *PacI* y *MluI* y el fragmento que contenía el gen S quimérico fue introducido en los mismos sitios de los plásmidos pBAC-TGEV-SC11-P-M o pBAC-TGEV-SC11-RS (Ortego, J., y col., 2003). Todos los pasos de clonaje se confirmaron mediante

secuenciación de los fragmentos de PCR y de las uniones en los sitios de restricción.

## 5.2. Construcción de plásmidos para el ensamblaje del clon infectivo del PEDV

La secuencia del genoma del PEDV USA/Iowa/18984/2013 (GenBank KF804028), se dividió en 6 fragmentos que se sintetizaron químicamente y se obtuvieron de BioBasic (Canadá) (Tabla 1). Debido a problemas de toxicidad, el fragmento completo F5 obtenido a partir de los fragmentos F5A y F5B, y el fragmento F6, se clonaron en un pBAC, generándose los plásmidos pBAC-F5 y pBAC-F6, respectivamente. Las secuencias sintetizadas contenían además dos mutaciones silenciosas: C9503>T, para eliminar un sitio *AvrII* en el fragmento F5; y T24745>C, para crear el sitio de restricción *SanDI* entre los fragmentos F3 y F1. Para la obtención del pBAC-PEDV<sup>FL</sup> (36293 bp) se realizó un ensamblaje secuencial de los fragmentos utilizando como procedencia de los elementos reguladores, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV) o las señales de terminación, el plásmido pBAC-MERS<sup>FL</sup> {Almazan, 2013 #11971}.

**Tabla 1. Plásmidos utilizados para el ensamblaje del cDNA infectivo de PEDV.**

PLÁSMIDO	SECUENCIA PEDV <sup>(a)</sup>	SITIOS RESTRICCIÓN	
		5'	3'
pUC57-F1	24745 - 28038	<i>SanDI</i>	<i>RsrII</i>
pUC57-F2	1 - 2807	<i>AscI</i>	<i>MluI</i>
pET-28b(+)-F3	16886 - 24745	<i>AvrII</i>	<i>SanDI</i>
pET-28b(+)-F4	13013 - 16886	<i>PacI</i>	<i>AvrII</i>
pUC57-F5A	6809 - 8913	<i>MluI</i>	<i>NcoI</i>
pUC57-F5B	8913 - 13013	<i>NcoI</i>	<i>PacI</i>
pUC57-F6	2807 - 6809	<i>MluI</i>	<i>MluI</i>

(a) Los números indican las posiciones en la secuencia del PEDV USA/Iowa/18984/2013 (GenBank KF804028)

La secuencia completa del cDNA infectivo se comprobó utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 6.

### **5.3. Construcción de plásmidos para la modificación del CPB del gen de la N de PEDV**

#### *5.3.1. Diseño de las secuencias mutantes*

Para el diseño de los mutantes del gen N, con distinto CPB, se realizó un estudio bioinformático en dos etapas que fue realizado en el servicio de Bioinformática para Genómica y Proteómica (BioinfoGP) del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Primero fue necesario calcular el CPB de todos los genes del genoma de cerdo (30585 genes, *ENSEMBL release 84*). Este cálculo se realizó siguiendo los procedimientos descritos previamente para el genoma humano {Coleman, 2008 #15674}. Del mismo modo, se calculó el CPB del gen N de la cepa PEDV USA/Iowa/18984/2013.

Posteriormente, una vez elegidos los cuatro nuevos CPBs para cada mutante (Tabla 2), se utilizó un algoritmo a medida para obtener hasta 200 posibles secuencias con el CPB deseado. De éstas, se filtraron aquellas que cumplieran los siguientes criterios: (1) no producir cambios significativos en la estructura secundaria del RNA, y (2) no generar ninguno de los sitios de restricción requeridos para los clonajes posteriores. Finalmente, se seleccionaron 4 secuencias que se nombraron como N1, N2, N3 y N4.

#### *5.3.1. Construcción de plásmidos para la mutación del gen N de PEDV*

Las secuencias que contenían los mutantes N1, N2, N3, N4 se obtuvieron por síntesis química en GeneArt (Alemania). Los plásmidos pMK-N1, pMK-N2, pMK-N3 y pMK-N4 que contenían los nucleótidos 32632 a 35987 del pBAC-PEDV, incluyendo las secuencias diseñadas, fueron digeridos con las enzimas *RsrII* y *BmgBI* para su introducción en los mismos sitios de restricción en el plásmido pUC57-F1 (Tabla 1), obteniéndose los plásmidos intermedios pUC57-F1-N1, pUC57-F1-N2, pUC57-F1-N3 y pUC57-F1-N4. Posteriormente, estos plásmidos se digirieron con las enzimas *SanDI* y *RsrII*. Los fragmentos, de 3347 bp, se clonaron en los mismos sitios del pBAC-PEDV<sup>FL</sup>, para la obtención de los plásmidos pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-N1, pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-N2, pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-N3 y pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-N4.

**Tabla 2. Resumen de los mutantes en el CPB del gen N.** CPBs seleccionados, número de secuencias filtradas y número de mutaciones introducidas comparados con el gen de la N parental (Nwt).

SECUENCIAS ENCONTRADAS				
GEN	CPB	ANTES DEL FILTRO	DESPUÉS DEL FILTRO	MUTACIONES
Nwt	0.03	-	-	-
N1	0.25	89	57	280
N2	0.20	101	61	191
N3	- 0.10	3	1	118
N4	- 0.20	7	2	221

#### 5.4. Construcción de plásmidos para la duplicación de las TRSs

Las secuencias codificantes para los productos F1-Swa, F1-Mre, F1-Pme y F1-Fse se obtuvieron por síntesis química, clonadas en el vector pMA-T (GeneArt, Alemania). El plásmido pMA-T-F1-Swa, que contenía los nucleótidos 24748 a 25242 de PEDV e incluía una diana SwaI y la duplicación de la TRS del gen N, fue digerido con *Bst*EII y *Avr*II dando un producto de 565 bp que se introdujo en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1, obteniéndose el plásmido pUC57-F1-SwaI. El plásmido pMA-T-F1-Mre, que contenía los nucleótidos 25242 a 25574 de PEDV e incluía una diana *Mre*I y la duplicación de la TRS del gen E, fue digerido con *Age*I y *Bst*EII dando un producto de 380 bp que se introdujo en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1, obteniéndose el plásmido pUC57-F1-MreI. El plásmido pMA-T-F1-Pme que contenía los nucleótidos 25574 a 25794 de PEDV e incluía una diana *Pme*I y la duplicación de la TRS del gen M, fue digerido con *Msc*I y *Age*I dando un producto de 238 bp que se introdujo en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1, obteniéndose el plásmido pUC57-F1-PmeI. El plásmido pMA-T-F1-Fse, que contenía los nucleótidos 26231 a 26895 de PEDV e incluía un sitio *Fse*I y la duplicación TRS del gen N fue digerido con *Sac*II y *Bmg*BI dando un producto de 684 bp que se introdujo en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1, obteniéndose el plásmido pUC57-F1-FseI.

Para generar los plásmidos intermedios con dos o más TRSs duplicadas, el plásmido pMA-T-F1-Swa fue digerido con *Bst*EII y *Avr*II dando un producto de

562 bp que se introdujo en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1-MreI obteniéndose el plásmido intermedio pUC57-F1-2RS que contenía las duplicaciones de las TRSs de los genes 3 y E. El plásmido pMA-T-F1-Pme fue digerido con *MscI* y *AgeI* dando un producto de 238 bp que se introdujo en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1-2RS, obteniéndose el plásmido intermedio pUC57-F1-3RS que contenía las duplicaciones de las TRSs de los genes 3, E y M. El plásmido pUC57-F1-N2 (apartado 5.3.1 de esta sección) que contenía el gen mutante N2 fue digerido con *RsrII* y *BmgBI* dando un producto de 1866 bp que fue introducido en los mismos sitios de los plásmidos pUC57-F1-2RS y pUC57-F1-3RS obteniéndose los plásmidos pUC57-F1-2RS-N2 y pUC57-F1-3RS-N2.

Para obtener un plásmido intermedio que contenía las duplicaciones de las TRSs de los genes 3, E, M y N además del gen mutante N2, se realizó una PCR solapante. La primera PCR se llevó a cabo usando como molde el plásmido pUC57-F1-N2. Los oligonucleótidos utilizados fueron N2-FseI-VS (5'-CTTCATTTAGTCTAAGGGCCGGCCTTACATTTAGTCTAACAGAACTTTATGGCATCTGTCAG-3', la diana *FseI* aparece subrayada) y P-N2-26756-RS (5'-GAAGTGACACCACCACGGTC-3'). La segunda PCR se llevó a cabo utilizando como molde el plásmido pUC57-F1-FseI y los oligonucleótidos N2-FseI-RS (5'-CTGACAGATGCCATAAAGTTTCTGTTTAGACTAAATGAAGGGCCGGCCTTAGACTAAATGAAG-3', la diana *FseI* aparece subrayada) y P-M-26138-VS (5'-TAGAGGGCTATAAGGTTGC-3'). Los productos obtenidos, de 276 bp y 450 bp respectivamente, se usaron como molde para la PCR solapante, utilizando los oligonucleótidos P-M-26138-VS y P-N2-26756-RS. El producto obtenido, de 916 bp fue digerido con las enzimas *RsrII* y *BmgBI* e introducido en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1-3RS-N2 dando lugar al plásmido pUC57-F1-4RS-N2.

Por último, los plásmidos pUC57-F1-2RS-N2, pUC57-F1-3RS-N2 y pUC57-F1-4RS-N2 fueron digeridos con *SanDI* y *RsrII*, y los insertos obtenidos se introdujeron en los mismos sitios del plásmido pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-N2 dando lugar a los plásmidos pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-2RS-N2, pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-3RS-N2 y pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-4RS-N2.

## **5.5. Construcción de plásmidos para la mutación de la proteína E**

Las secuencias de los mutantes  $\Delta E1$ ,  $\Delta E2$  y  $\Delta E3$  se obtuvieron por síntesis química, clonadas en el plásmido pMA-T (GeneArt, Alemania). El plásmido pMA- $\Delta E1$ , que contenía los nucleótidos 25241 a 25796 de PEDV con la eliminación de 30 nt que codifican los aa 36 a 45 de la proteína E, se digirió con *Bst*II y *Msc*I. El fragmento de 517 bp resultante, se clonó en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1-N2, obteniéndose el plásmido pUC57-F1- $\Delta E1$ -N2. Los plásmidos pMA- $\Delta E2$  y pMA- $\Delta E3$ , que contenían los nucleótidos 25572 a 25796 de PEDV con la eliminación de 27 y 36 nt, respectivamente, que codificaban los aa 45 a 53 ( $\Delta E2$ ) y 51 a 61 ( $\Delta E3$ ) de la proteína E, se digirieron con *Age*I y *Msc*I. Los fragmentos de 189 bp y 180 bp resultantes se introdujeron en los mismos sitios del plásmido pUC57-F1-N2, generándose los plásmidos pUC57-F1- $\Delta E2$ -N2 y pUC57-F1- $\Delta E3$ -N2, respectivamente.

Los plásmidos pUC57-F1- $\Delta E1$ -N2, pUC57-F1- $\Delta E2$ -N2 y pUC57-F1- $\Delta E3$ -N2 fueron digeridos con *Sal*DI y *Rsr*II, y los insertos obtenidos se introdujeron en los mismos sitios del plásmido pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-N2 dando lugar a los plásmidos pBAC-PEDV<sup>FL</sup>- $\Delta E1$ -N2, pBAC-PEDV<sup>FL</sup>- $\Delta E2$ -N2 y pBAC-PEDV<sup>FL</sup>- $\Delta E3$ -N2.

## 6. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL RNA

### 6.1. Extracción y purificación del RNA total intracelular

Para verificar la secuencia, analizar la estabilidad de los virus recombinantes generados, y cuantificar la expresión de los RNAs virales y celulares, se extrajo el RNA total de las células infectadas utilizando el reactivo *RNeasy Mini kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA purificado se cuantificó mediante espectrofotometría, utilizando NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EE.UU.), y se guardó a -80°C hasta su utilización.

### 6.2. Análisis del RNA mediante RT-PCR

La síntesis de cDNAs o retrotranscripción (RT) a partir de los RNAs purificados se realizó con el reactivo *High Capacity cDNA reverse transcription Kit* (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando 100 ng de RNA como molde.

Una fracción del cDNA generado (1/20 a 1/10 del volumen de reacción) se utilizó como molde para su posterior amplificación por PCR, usando



oligonucleótidos específicos, según los protocolos descritos en el apartado 4.4. de esta sección.

### 6.3. Cuantificación de RNAs mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La expresión diferencial de los RNAs virales o celulares se analizó mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), utilizando la tecnología TaqMan®. La reacción de RT se realizó con el reactivo *High Capacity cDNA reverse transcription Kit* (Life Technologies) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Para la cuantificación de RNAs virales se emplearon ensayos TaqMan®, compuestos por los oligonucleótidos y la sonda específicos para cada caso, indicados en la Tabla 3. Los RNAs celulares se cuantificaron utilizando los ensayos TaqMan® comerciales (Life Technologies) indicados en la Tabla 4.

**Tabla 3. Ensayos Taqman® específicos utilizados para cuantificar RNAs virales.**

SECUENCIA (5'-3')		
AMPLICIÓN	SONDA (a)	OLIGONUCLEÓTIDOS
mRNA-M PEDV	CAACTAAACGAAATATGTCTAAC	GGATAGTTAGCTCTTTTCTAGACTCTTGT
		CACCTCATCAACGGGAATAGAAC
gRNA PEDV	TGTA CTGGCTTACTGGTGTT	TGTTGCTATGTTTGTGCATTGG
		TCTGAATCACTAGGCTGACCTTTG
gRNA TGEV	CTGTTCAACGTATGTTT	TGAACGTGTGTCTGTTTCTTTTGA
		CTAGGCAACTGGTTTGTAACATCTTT

(a) Todas las sondas contienen 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y un grupo de unión al surco menor del DNA (MGB) en el extremo 3'

En todos los casos, la reacción se realizó con el reactivo *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega). La qPCR se realizó en un equipo *7500 Real Time PCR System* (Life Technologies), utilizando los parámetros de termociclación: (a) 95°C, 10 min; (b) 95°C; 15 seg; (c) 60°C, 1 min; (40 ciclos). Los datos se analizaron utilizando el programa *7500 software v2.0.6* (Life Technologies). Todos los experimentos cumplen con las recomendaciones para el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR (MIQE) {Bustin, 2009 #11559}. En todos los casos se

analizaron al menos, tres experimentos independientes, y cada muestra se analizó por triplicado. Los valores correspondientes a las medias de los valores de los ciclos de corte (Ct) se usaron para calcular los valores de expresión relativos utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  {Livak, 2001 #10334}. El nivel del gen de la betaglucuronidasa B porcina (GUSB) se utilizó como control de referencia, dado que su expresión permanece invariable durante la infección con el TGEV y el PEDV, mientras que el nivel de los distintos sgRNAs virales se normalizó utilizando el gRNA viral.

**Tabla 4. Ensayos Taqman® comerciales utilizados para la cuantificación de RNAs celulares.**

GEN <sup>(a)</sup>	ID DEL ENSAYO <sup>(b)</sup>	DESCRIPCIÓN
GUSB	Ss03387751_u1	$\beta$ -Glucuronidasa
IFNB1	Ss03378485_u1	Interferón beta (IFN- $\beta$ )
TGFB1	Ss03382325_u1	Factor transformante del crecimiento $\beta$ 1
TNF	Ss03391318_g1	Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )

(a) De acuerdo con la nomenclatura de la *Human Genome Organization* (HUGO) (HGNC, <https://www.genenames.org>)

(b) Los ensayos específicos de genes porcinos eran de ThermoFisher Scientific

## 7. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS Y RESCATE DE VIRUS RECOMBINANTES

Células BHK-pAPN crecidas al 90% de confluencia en placas de 35 mm de diámetro en medio DMEM con 10% de FCS se transfectaron con 6  $\mu$ g de los cDNAs infectivos correspondientes y 18  $\mu$ l de Lipofectamina2000 (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de un periodo de incubación de 6 h a 37°C, las células se levantaron con 200  $\mu$ l de tripsina-EDTA (25%). La tripsina se inactivó con 1.5 ml de DMEM con 10% de FCS, se centrifugaron las células a 5000  $xg$  durante 5 min y el sedimento se resuspendió en DMEM. La suspensión de células se añadió sobre una monocapa confluyente de células Vero crecidas en placas de 35 mm de diámetro previamente lavadas con PBS y a las que se añadió medio de infección y 5  $\mu$ g/ml de tripsina. Después de un periodo de incubación de 48 h, se recogió el sobrenadante de las células

(nombrado como pase 0). Los virus recombinantes rescatados se clonaron tres veces mediante dilución límite. Los virus clonados se amplificaron y se titularon en células Vero siguiendo los protocolos previamente descritos en el apartado 2.2 de esta sección.

## **8. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **8.1. Inmunomicroscopía de fluorescencia indirecta (inmunofluorescencia)**

Células Vero, crecidas sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro en placas de cultivos de 24 pocillos a una confluencia del 70%, se infectaron a una moi de 0.01 con los rPEDVs correspondientes. Después de 8 h, las células se lavaron tres veces con PBS, se fijaron mediante incubación con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron mediante incubación con metanol frío durante 10 min. Para su análisis mediante inmunofluorescencia, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con solución de bloqueo (10% FBS filtrado en PBS) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5), diluido en solución de bloqueo durante 90 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células tres veces con PBS. Para la detección se utilizaron anticuerpos secundarios específicos frente a ratón o conejo, en función del anticuerpo primario empleado, conjugados a los fluoróforos Alexa 488 o Alexa 594 (Life Technologies) diluidos 1:500 en solución de bloqueo. Después de la incubación con el anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente, las células se lavaron cinco veces con PBS y los núcleos se tiñeron por incubación con el reactivo 4'-6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 1 mg/ml en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos para retirar el DAPI y las muestras se montaron sobre portaobjetos utilizando el reactivo *ProLong Gold anti-fade reagent* (Life Technologies) y se examinaron con un microscopio confocal *Leica SP5 laser scanning microscope* (Leica). Las imágenes se tomaron y procesaron con el programa LAS AF (Leica).

Tabla 5. Lista de anticuerpos empleados en inmunodetección de proteínas

ANTICUERPO	TIPO <sup>(a)</sup>	ORIGEN <sup>(b)</sup>	ESPECIE <sup>(c)</sup>	DILUCIÓN DE TRABAJO <sup>(d)</sup>	
				IF	WB
Anti N PEDV (N-15)	mAb	Dr. M. Ackermann	Ratón	1:500	1:2000
Anti nsp4 HCoV-229E	pAb	Dr. J. Ziebuhr	Conejo	-	1:1000
Anti nsp5 HCoV-229E	pAb	Dr. J. Ziebuhr	Conejo	-	1:1000
Anti nsp2 HCoV-229E	pAb	Dr. J. Ziebuhr	Conejo	-	1:2000
Anti nsp3 HCoV-229E	pAb	Dr. J. Ziebuhr	Conejo	-	1:1000
Anti nsp8 HCoV-229E	pAb	Dr. J. Ziebuhr	Conejo	-	1:2000
Anti nsp3 TGEV	pAb	Lab. CoV	Conejo	-	1:5000
Anti nsp12 TGEV	pAb	Lab. CoV	Conejo	-	1:100
Anti nsp14 TGEV	pAb	Lab. CoV	Conejo	-	1:1000
Anti $\beta$ -actina (13-E5)	mAb	Cell Signalling Tech.	Conejo	-	1:5000

(a) mAb, anticuerpo monoclonal; pAb, anticuerpo policlonal

(b) Casas comerciales o laboratorios donde se obtuvieron los anticuerpos. Dr. Mathias Ackermann, University of Zürich, Suiza. Dr. John Ziebuhr, Justus Liebig University, Giessen, Alemania.

(c) Especie animal en la que se generó el anticuerpo

(d) IF, inmunofluorescencia; WB, *Western blot*

## 8.2. Inmunodetección de proteínas (*Western blot*)

Se obtuvieron extractos de proteínas de células infectadas a una moi de 1, por lisis celular mediante incubación con una solución de extracción de proteínas [50 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 1x inhibidor de proteasas Complete (Roche)]. Las células lisadas se centrifugaron a 13000  $\times g$  durante 10 min a 4°C y el sobrenadante, que contenía el extracto de proteínas citoplasmáticas se almacenó a -20°C hasta su utilización. Los extractos de proteínas se analizaron en geles desnaturalizantes de gradiente de acrilamida-SDS *NuPAGE Novex 4-12% Bis/Tris Precast Gels* (Life Technologies) utilizando

tampón de carga *NuPAGE Sample Buffer* (Novex, Life Technologies) suplementado con 100 mM de ditioneitol (DTT), y *NuPAGE MOPS SDS Running Buffer* (Novex, Life Technologies) como solución electrolito. Las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immun-Blot PVDF, Bio-Rad), previamente activadas por incubación en metanol durante 5 minutos, mediante el sistema *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad). Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche en polvo al 5% en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) y se incubaron con los anticuerpos primarios específicos (Tabla 5), diluidos en TBS con leche en polvo al 3% durante 12 h a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TTBS (20 mM TRIS-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa del rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich), específico para la especie correspondiente al anticuerpo primario utilizado, diluido 1:30000 en TTBS con leche en polvo al 3%. Después de lavar exhaustivamente las membranas con TTBS, los anticuerpos unidos se detectaron utilizando el reactivo *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) y un captador de imágenes *ChemiDoc XRS+ System* (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante análisis densitométrico utilizando el programa *ImageLab* (Bio-Rad).

## **9. ENSAYOS IN VIVO**

### **9.1. Declaración ética**

Los protocolos de experimentación animal se realizaron en estricta conformidad con la directiva europea 2010/63/UE y la ley nacional RD 53/2013 sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros propósitos científicos, así como con la ley nacional 32/2007 referida al bienestar animal en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Todos los experimentos se realizaron en *Prophyl Ltd*, (Mohacs, Hungría) y los protocolos empleados fueron aprobados por el comité ético local el 8 de febrero de 2017. El Comité Nacional de Ética Científica en Experimentación animal aprobó los protocolos el 28 de febrero de 2017 [BA02/2000-19/2017(KA-2122)].

## **9.2. Análisis de la virulencia**

Lechones de 5 días de edad, no deprivados de calostro y nacidos de madres seronegativas para los virus TGEV y PEDV, fueron asignados aleatoriamente a grupos de nueve animales. Además, se dejó un grupo de tres animales no infectados como control, que se sacrificó al final del experimento. El resto de los animales se infectaron con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal del virus correspondiente por vía oral. Se monitorizaron el peso y los signos clínicos diariamente.

## **9.3. Análisis de la protección**

Veintiún cerdos de 21 días de edad, seronegativos para TGEV y PEDV, se dividieron en cuatro grupos. Los cerdos de los grupos 1 y 2 fueron inoculados con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal del candidato a vacuna y el control positivo, respectivamente. Los cerdos de los grupos 3 y 4 no fueron inoculados. Tres semanas después de la inmunización, los cerdos de los grupos 1, 2 y 3 fueron desafiados con  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/animal de rPEDV-CM1 por vía oral. Los animales infectados fueron monitorizados diariamente.

## **9.4. Seguimiento de la enfermedad y toma de muestras**

En el caso del ensayo de virulencia, el peso de los animales y los signos clínicos como diarrea y deshidratación se monitorizaron cada día durante la duración del experimento. Se recogieron hisopos con muestras de heces cuando apareció diarrea. Las muestras de tejido intestinal (proximal, medio y distal) se tomaron los días 2, 4 y 6 después de la inoculación. Estas muestras se congelaron para la titulación de virus, se estabilizaron con *RNAlater* (Life Technologies) para extracción de RNA, o se fijaron con Zinc-formalina (Sigma-Aldrich) para histopatología.

En los ensayos de protección, el peso de los animales se monitorizó cada 7 días. Las muestras de heces se tomaron a los días 0, 7, 21, 25, 28 y 31 después de la primera inoculación. Se tomaron muestras de suero los días 0, 21, 28 y 31 después de la primera inoculación, y muestras de saliva los días 21, 28 y 31, utilizando *Salivette tubes* (Sarstedt). Tres animales por grupo fueron sacrificados y se tomaron las muestras de tejido a los días 4 y 10 después del desafío (25 y 31 después de la primera inmunización). En el momento del sacrificio se evaluó la presencia de lesiones macroscópicas en el intestino. Se extrajeron muestras

representativas de yeyuno (proximal, medio y distal), que se guardaron en tubos estériles a -20°C para la determinación del título viral, así como muestras de tejido intestinal en tubos con *RNAlater* (Life Technologies) para el análisis de RNA viral, o fijadas en Zinc-formalina (Sigma-Aldrich) para histopatología.

### **9.5. Extracción de RNA de intestino**

Se utilizaron tres fragmentos representativos, de 500 mg cada uno, de los intestinos de los cerdos infectados (intestino proximal, medio y distal). Cada uno de los fragmentos se homogenizó en 1.5 ml de tampón *RLT lysis buffer* (QIAGEN) suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol al 1%, empleando el sistema *gentleMACS Dissociator* (Milty Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los homogenizados correspondientes a la misma muestra se combinaron y se centrifugaron a 3000 *xg* durante 10 minutos. El RNA total se purificó a partir de los sobrenadantes utilizando el reactivo *RNeasy mini kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **9.6. Extracción de RNA de heces**

Para extraer el RNA presente en las muestras fecales, se resuspendió el hisopo en 300  $\mu$ l de PBS con antibióticos (40 U/ml penicilina-estreptomicina, 200  $\mu$ g/ml gentamicina, 1  $\mu$ g/ml anfotericina B). el RNA se extrajo a partir de 140  $\mu$ l de esta solución, empleando el reactivo *QIAamp Viral Mini kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **9.7. Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)**

La presencia de anticuerpos específicos frente al PEDV y TGEV se evaluó mediante ELISA. Para ello, placas de ELISA de 96 pocillos *Maxisorp* (Nunc) se tapizaron con los virus TGEV (0.75  $\mu$ g/pocillo) o PEDV (0.75  $\mu$ g/pocillo) parcialmente purificados (apartado 2.3 de esta sección). Para ello, se incubaron con el antígeno correspondiente diluido en solución de lavado (0.1% albúmina de suero bovino o BSA, 0.05% Tween-20 en PBS), durante 12 h a 4°C. Posteriormente, se bloquearon con BSA al 5% en PBS durante 2 h a 37°C y se incubaron con diluciones 1:20, 1:80 y 1:320 de los sueros en solución de lavado durante 90 min a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces con solución de lavado. Los anticuerpos unidos se detectaron incubando con proteína A conjugada a

peroxidasa (Sigma), un anticuerpo de cabra frente a IgG o un anticuerpo de cabra frente a IgA porcino (Bio-Rad), diluidos 1:10000 en PBS con 0.1% BSA durante 30 minutos a 37°C. El ELISA se desarrolló con el reactivo *K-Blue MAX TBM Substrate* (Neogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinó la absorbancia a 450 nm (A450) empleando un lector *Microplate Reader* 680 (Bio-Rad) y el programa *Microplate Manager* 5.2.1. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizaron a partir de los valores obtenidos en cada placa para un suero control positivo, obtenido de un cerdo 15 días después de la infección por el PEDV, el TGEV, y un suero control negativo, obtenido de un cerdo no inmune para el PEDV ni el TGEV, y se expresaron como el SP ratio [SP ratio= (A450 suero problema-A450 suero control negativo)/(A450 suero control positivo-A450 suero control negativo)].

#### **9.8. Evaluación de la capacidad neutralizante de los sueros**

Los sueros se descomplementaron e incubaron durante 1 hora a 37°C con 100 unidades formadoras de placas (pfu) de PEDV en DMEM con 5% FCS. Se realizaron diluciones seriadas de la mezcla y éstas se añadieron a células Vero confluentes en una placa M-96. Después de 1 hora de incubación se retiró el medio y se añadió medio de infección. Después de 72 horas las células se fijaron con formaldehído al 10% en PBS, fueron teñidas con cristal violeta y se calculó el título. El índice de neutralización se definió como el logaritmo del ratio de TCID<sub>50</sub> en ausencia o presencia de suero.

#### **9.9. Análisis histopatológico**

Muestras representativas del intestino proximal, medial y distal de cerdos infectados, obtenidas 2, 4 y 6 días después de la infección o 25 y 31 días después de la primera inmunización, en el caso de los ensayos de protección, y se fijaron con zinc-formalina. Estas muestras fijadas se lavaron 2 veces con PBS y se almacenaron a 4°C en etanol al 70%. Las muestras se embebieron en parafina y se realizaron secciones de 4 µm de grosor cada 200 µm. El análisis histopatológico se basó en la observación de secciones teñidas con hematoxilina y eosina, realizadas por el laboratorio de histología (*Autopsy Path Kft*, Budapest, Hungría). Las muestras se visualizaron con un microscopio ZEISS Aixophot, y las imágenes se tomaron y procesaron con el programa NIS-Elements F2.20



(Nikon). El daño intestinal se cuantificó analizando la medida de tres microvellosidades y criptas en cada localización. Se midieron, al menos, 2 localizaciones diferentes por sección por cada animal. El ratio entre la altura de los villi y la profundidad de las criptas (VH/CD) fue calculado con estas medidas.

## 10. SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DEL rPEDV-CM1

Para verificar la secuencia del virus rPEDV-CM1, obtenido a partir del cDNA infectivo, así como de sus mutantes derivados, se realizaron RT-PCRs empleando los oligonucleótidos utilizados incluidos en la tabla 6. Los productos de PCR se secuenciaron y las secuencias obtenidas se ensamblaron utilizando el software SeqMan del paquete *DNAStar Lasergene®* 14.2 (Madison, WI).

**Tabla 6. Lista de oligonucleótidos de PEDV utilizados en PCR y secuenciación.**

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN EXTREMO 5' (a)
CMV1RS	GTCGTAACAACCTCCGCC	
Ld_15_VS	CTATCTACGGATAGTTAGC	15
1a_700_VS	GATTTCTTTGCTGACTCCG	700
1a_716_RS	ATACAGATTTCTTTGCTGACTC	716
1a_1686_VS	CTTCTTGAATGAGCTTTTTGAGT	1686
1a_1702_RS	TGTCAACTTCTTGAATGAGCTTT	1702
1a_2669_VS	CCAGTGTCCCAAAAATTGTTTT	2669
1a_2685_RS	ATGCCACCAGTGTCCCAAAAATT	2685
1a_3661_VS	CGCAAATGCTATGAGTCACAAAA	3661
1a_3677_RS	ATGGTTCGCAAATGCTATGAGTC	3677
1a_4642_VS	GGCTTGGTAGATGCTATTTTCAA	4642
1a_4685_RS	ATGGATGGCTTGGTAGATGCTAT	4685
1a_5623_VS	GGTCAGCCTAGTGATTCAGAAAA	5623

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN EXTREMO 5' (a)
1a_5639_RS	GACAAAGGTCAGCCTAGTGATTC	5639
1a_6607_VS	GGTAATGTGATGCCTTTCTTTTA	6607
1a_6623_RS	TTAATTGGTAATGTGATGCCTTT	6623
1a_7602_VS	CGTCCATGACATTGCCACGTGTA	7602
1a_7618_RS	ACTTCCCGTCCATGACATTGCCA	7518
1a_8585_VS	CATTGTTGATGAACGTTATTAGT	8585
1a_8601_RS	TCTTTACATTGTTGATGAACGTT	8601
1a_9003_VS	TCATTGAATGTTCCATGGTCCATA	9003
1a_9568_VS	CACACGCCTAAGTACACCTATCG	9568
1a_9584_RS	GTCCACACGCCTAAGTACAC	9584
1a_10551_VS	CGGCACATACACATGGCGCTTTT	10551
1a_10567_RS	TTTACACGGCACATACACATGGC	10567
1a_11534_VS	CTATGCATTCACTGCTTTTTTGGT	11534
1a_11550_RS	AGTGCTATGCATTCACTGCTT	11550
1a_12517_VS	CTTGAGAATGACGTTTGCA	12517
1a_12533_RS	TTTGTACTTGAGAATGACGTTTG	12533
1b_13500_VS	CACTGTGCCAACTTCAATACG	13500
1b_13516_RS	TTCCTGTGCCAACTTCAA	13516
1b_14483_VS	GATTTTAGGCTCTAAGCACACCA	14483
1b_14499_RS	GCCATGATTTTAGGCTCTAAGC	14499
1b_15464_VS	TGATCATGTCATTGGAACAACCTC	15464
1b_15480_RS	TGCTTATGATCATGTCATTGGAA	15480
1b_16447_VS	CTACTGTCAATGCTTTGCCAGAG	16447

<b>OLIGONUCLEÓTIDO</b>	<b>SECUENCIA (5'-3')</b>	<b>POSICIÓN EXTREMO 5' <sup>(a)</sup></b>
<b>1b_16463_RS</b>	TTTTCTCTACTGTCAATGCTTTG	16463
<b>1b_17430_VS</b>	GACGTTGAAGGAGCACATG	17430
<b>1b_17446_RS</b>	GGCTTTGACGTTGAAGGAGCACA	17446
<b>1b_18411_VS</b>	CATGCATTCCATACACCGGCTTT	18411
<b>1b_18427_RS</b>	AATAATCATGCATTCCATACACC	18427
<b>1b_19391_VS</b>	CGTTGTGTATGGTGATGTTTCAA	19391
<b>1b_19407_RS</b>	TGAGCACGTTGTGTATGGTGATG	19407
<b>1b_20391_VS</b>	GACGGCAACACTATGCATGCCA	20391
<b>1b_20407_RS</b>	GTGATTGACGGCAACACTATGCA	20407
<b>S_21374_VS</b>	GGCCACATACCAGAAGGTTTTAG	21374
<b>S_21390_RS</b>	CCCAATGGCCACATACCAGAAGG	21390
<b>S_22356_VS</b>	CCTTGCAATCTGTTAATGA	22356
<b>S_22372_RS</b>	CTTTCACCTTGCAATCTGTTAAT	22372
<b>S_23357_VS</b>	GGCCTTGGTACTGTTGATGA	23357
<b>S_23373_RS</b>	ACTAATGGCCTTGGTACTGTTGA	23373
<b>S_24306_VS</b>	GTTGTGTGGTCACCTATGTCAAT	24306
<b>S_24322_RS</b>	GAGAGTTGTGTGGTCACCTAT	24322
<b>ORF3_25289_VS</b>	GCATCGACTTGTATCTAGCT	25289
<b>ORF3_25305_RS</b>	TTAGTAGCATCGACTTGTATCTA	25305
<b>M_26272_VS</b>	CTTTCTATGTCCGGTCCAAACAC	26272
<b>M_26288_RS</b>	GTTGGGCTTTCTATGTCCGGTCC	26288
<b>N_26726_RS</b>	GGTGTGAGAAAGGCGTCTG	27726
<b>N_27255_VS</b>	CTTGCTTCGGACCCAGGGG	27255

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')	POSICIÓN EXTREMO 5' <sup>(a)</sup>
N_27271_RS	GCTTGCTTCGGACCCAGG	27271
BGH1VS	CTCCCACTGTCCTTTCC	
BGH1RS	CTCCCACTGTCCTTTCC	

(a) Se muestra la posición sólo en los oligonucleótidos que hibridan con genoma de PEDV

## 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

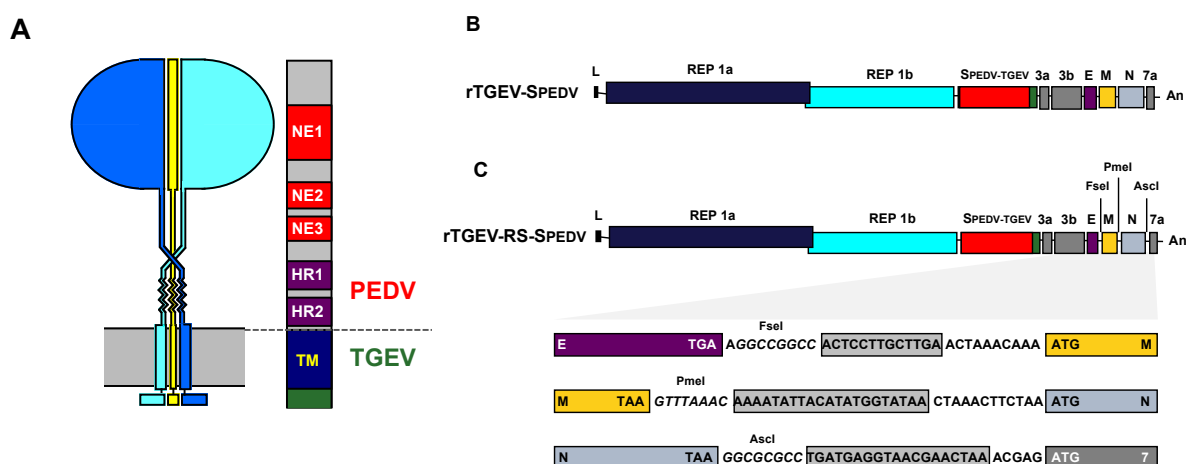
Todos los resultados se expresaron como la media de los datos  $\pm$  la desviación estándar (SD). Para analizar las diferencias en los valores medios entre los distintos grupos se utilizó el test de la t de Student. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor fue inferior a 0.05.

## ***RESULTADOS***

## 1. VACUNAS VIVAS MODIFICADAS BASADAS EN UN VIRUS TGEV-PEDV QUIMÉRICO

### 1.1. Diseño y construcción de un virus TGEV-PEDV quimérico

Se diseñó un gen que codificaba una proteína S quimérica (SPEDV-TGEV) cuyo extremo amino terminal contenía el ectodominio de la proteína S de un PEDV americano virulento (aa 1 a 1325) (Fig. 7A), incluyendo los epítomos reconocidos por anticuerpos neutralizantes (NE) y los dominios con héptadas repetitivas (HR). El extremo carboxilo terminal contenía el endodominio de la proteína S del virus TGEV-C11 (aa 1389 a 1448), incluyendo el dominio transmembrana (TM) (Fig. 7A). El gen de la proteína SPEDV-TGEV se clonó en el cDNA infeccioso de TGEV, sustituyendo la proteína S original (rTGEV-SPEDV, Fig. 7B). Además, el gen que codificaba la proteína SPEDV-TGEV se introdujo en el cDNA infeccioso de un TGEV atenuado mediante una estrategia basada en la duplicación de las TRSs y la introducción de sitios únicos de restricción (RS), para evitar el solapamiento de genes consecutivos (Ortego, J., y col., 2003) (rTGEV-RS-SPEDV, Fig. 7C).

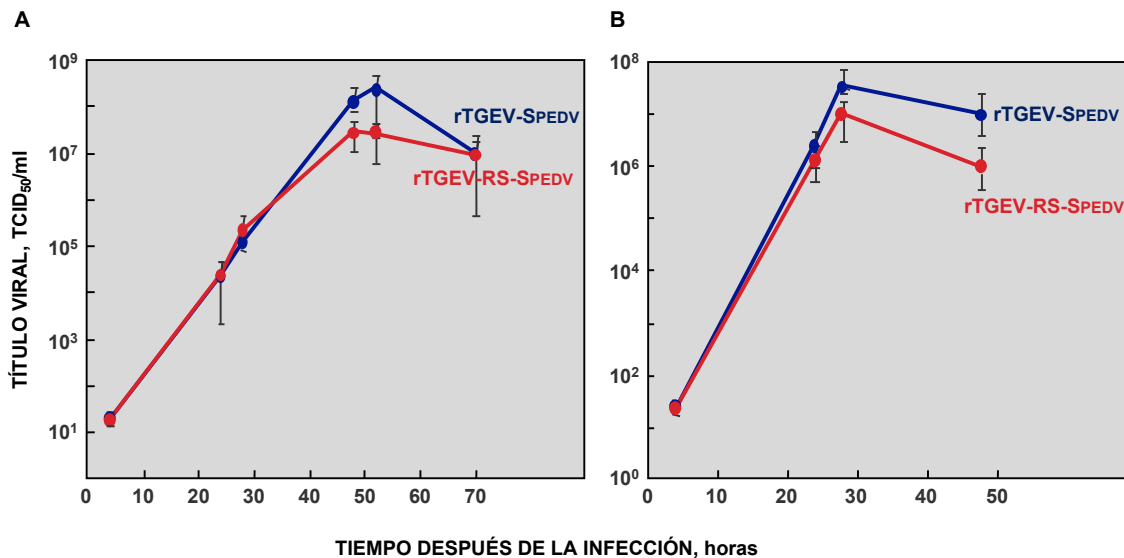


**Figura 7. Generación de los virus rTGEV-SPEDV.** (A) Diagrama de la proteína S quimérica expresada por los virus recombinantes. A la izquierda se representa el peplómero de la proteína S. El esquema de la derecha representa las partes de la secuencia que provienen del PEDV y del TGEV. Se indican además los dominios relevantes: NE, dominios reconocidos por anticuerpos neutralizantes; HR, dominio con héptadas repetitivas; TM, dominio transmembrana. (B) Esquema del genoma del virus TGEV recombinante que contiene una proteína S quimérica (SPEDV-TGEV). Las etiquetas sobre las cajas indican los genes virales. L, secuencia líder; An, cola poli A. (C) Esquema del virus rTGEV recombinante que expresa la proteína S quimérica, basado en una secuencia de un virus atenuado mediante la duplicación de las TRSs y la introducción de

## Resultados

sitios de restricción (Ortego, J., y col., 2003). Los sitios de restricción introducidos se muestran en cursiva. Las secuencias duplicadas están indicadas en cajas de color gris claro y cada gen en las cajas con los mismos colores que en el esquema del virus, indicando el codón de parada y de inicio.

Los virus recombinantes rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV se rescataron mediante transfección en células Vero de los cDNAs infectivos correspondientes. Las cinéticas de crecimiento en células Vero mostraron que ambos virus alcanzaban sus títulos máximos a 24 o 48 hpi, dependiendo de la moi utilizada (Fig. 8). Sin embargo, los títulos del virus rTGEV-RS-SPEDV fueron entre 5 y 10 veces inferiores a los del virus parental rTGEV-SPEDV (Fig.8).

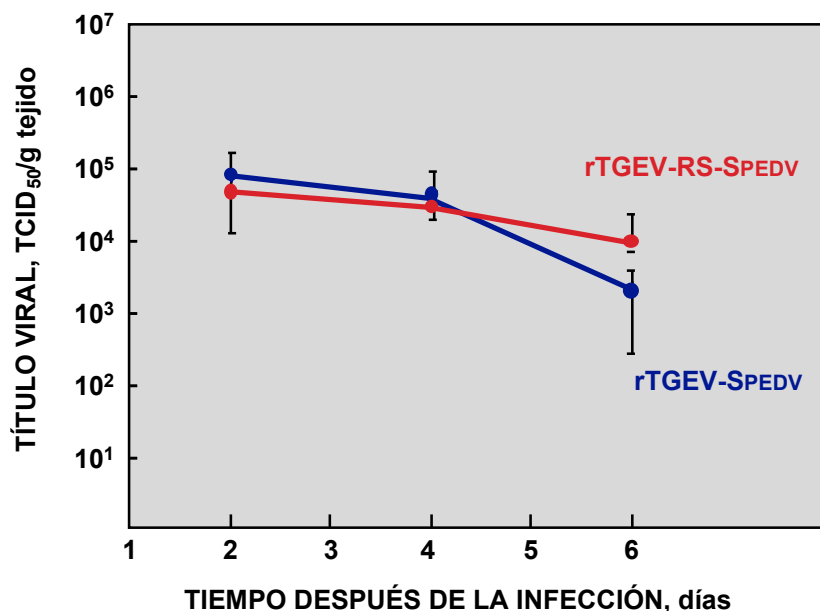


**Figura 8. Cinética de crecimiento de los virus rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV en cultivos celulares.** Se infectaron células Vero a una moi de 0.001 (A) o 0.1 (B) con los virus rTGEV-SPEDV (azul) y rTGEV-RS-SPEDV (rojo). Se analizó el título viral a los tiempos indicados después de la infección. Los datos representan la media de tres infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

### 1.2. Virulencia de los virus quiméricos

La virulencia de los virus rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV se analizó inoculando lechones de cinco días de edad con 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/animal. Cabe destacar que, a pesar de las diferencias en el título viral observadas en cultivos celulares (Fig. 8), ambos virus mostraron títulos similares en el intestino de los animales infectados (Fig. 9). Curiosamente, a 6 días después de la inoculación,

el rTGEV-S<sub>PEDV</sub> mostró títulos ligeramente inferiores a los del rTGEV-RS-S<sub>PEDV</sub>, sugiriendo que existía un menor número de enterocitos disponibles para la reinfección.

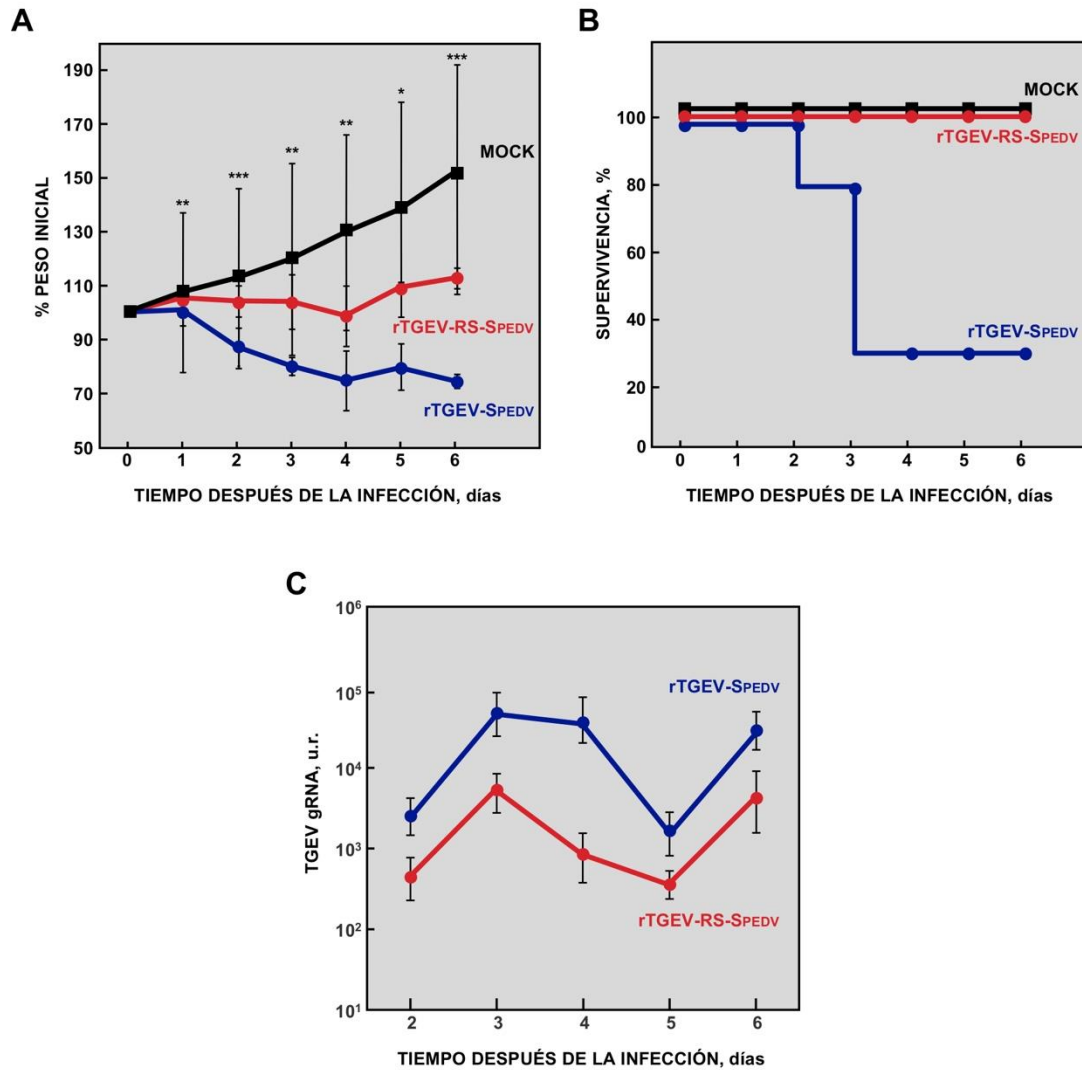


**Figura 9. Replicación de los virus rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV in vivo.** Se inocularon oralmente animales de 5 días de edad con 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/animal. Se analizó el título viral en el intestino a diferentes días después de la infección. Los datos representan la media de tres animales independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

Los animales inoculados con el virus rTGEV-SPEDV perdieron peso (Fig. 10A) y un 70% murieron (Fig. 10B). Estos datos indicaron que el virus rTGEV-SPEDV era virulento. En cambio, los animales inoculados con el rTGEV-RS-SPEDV no perdieron peso (Fig. 10A) y mostraron una supervivencia del 100% (Fig. 10B), indicando que el virus estaba atenuado. Aunque en ambos casos los animales inoculados presentaron diarrea severa (datos no mostrados), la diseminación viral en las heces de los animales infectados con el virus rTGEV-RS-SPEDV fue hasta 50 veces menor que la observada en los lechones infectados con el virus rTGEV-SPEDV (Fig. 10C).



## Resultados

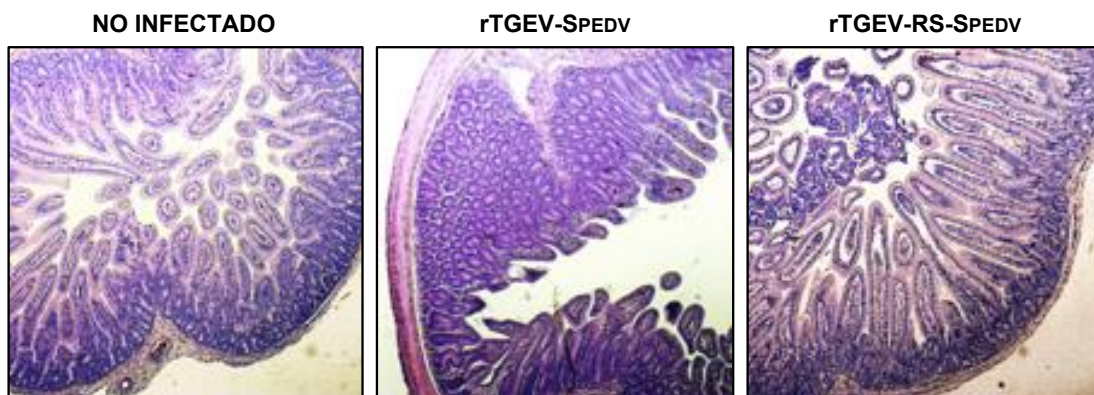


**Figura 10. Virulencia del rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV.** Se inocularon oralmente animales de 5 días de edad con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal con el virus rTGEV-SPEDV (azul) y el rTGEV-RS-SPEDV (rojo). Como control se utilizó un grupo de lechones sin inocular (Mock, negro). Se analizó la pérdida de peso (A) y la supervivencia (B). (C) La carga viral en las heces se evaluó mediante RT-qPCR. u.r., unidades relativas. Los datos representan la media de nueve animales independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso. p-valor, \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

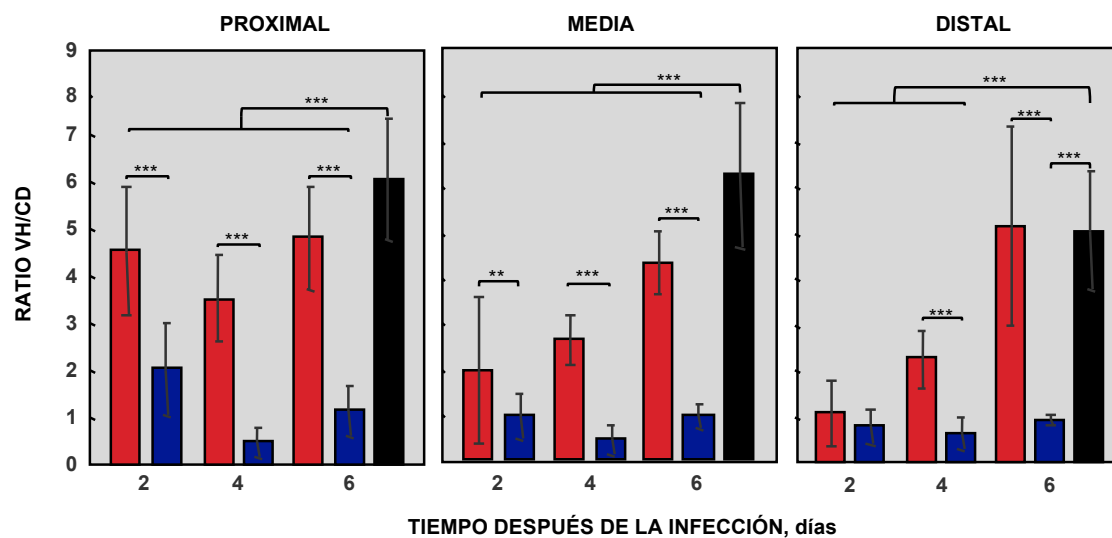
En consonancia con los signos clínicos, se observó degeneración epitelial y exfoliación en diferentes partes del yeyuno de los animales infectados con el virus rTGEV-SPEDV, junto con infiltración inflamatoria y acortamiento de los villi (Fig. 11A). El daño intestinal fue significativamente inferior en animales inoculados con el virus atenuado rTGEV-RS-SPEDV en comparación con los

inoculados con el virus virulento rTGEV-SPEDV (Fig. 11B). Estos resultados confirmaron la atenuación del virus rTGEV-RS-SPEDV.

**A**



**B**



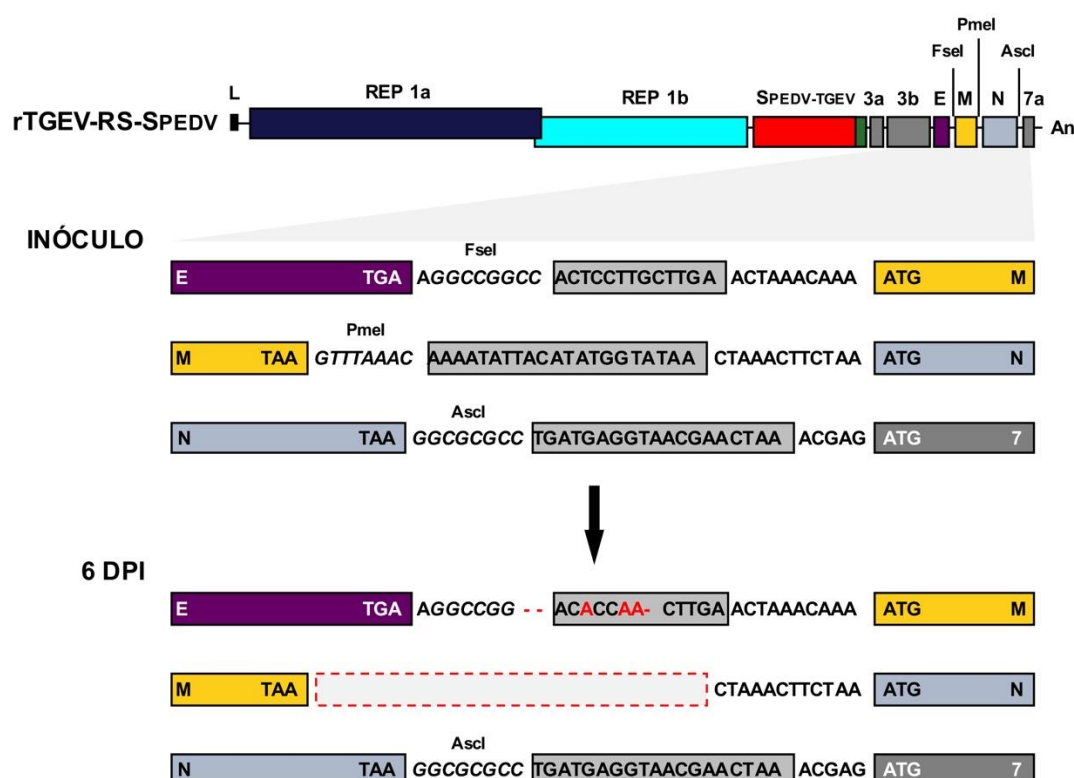
**Figura 11. Daño intestinal en lechones inoculados con rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV.**

(A) Secciones representativas del intestino de animales no infectados, o de animales infectados con los virus rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV, a 6 días después de la inoculación y teñidas con hematoxilina-eosina. Las imágenes se tomaron con un objetivo 2.5x. (B) Ratio entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas (VH/CD) en muestras de intestino proximal, medio y distal a diferentes días después de la inoculación. En animales no infectados (negro) o animales infectados con los virus rTGEV-SPEDV (azul) o rTGEV-RS-SPEDV (rojo). Los datos representan la media de tres animales independientes y de dos campos microscópicos por sección. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso. p-valor, \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ .

### 1.3. Estabilidad genética del virus rTGEV-RS-SPEDV

La bioseguridad de las vacunas vivas atenuadas es una de las mayores preocupaciones para su aplicabilidad. La reversión al fenotipo virulento o la recombinación con las cepas circulantes es uno de los motivos de la emergencia de cepas de PEDV virulentas, especialmente en Asia (Wang, Q., y col., 2019). La estabilidad genética del virus rTGEV-RS-SPEDV, que podía influir en su seguridad como candidato a vacuna, se evaluó en cultivos celulares. Después de 15 pases en células Vero, se secuenció la región del genoma viral que comprendía desde el gen 3b hasta el 3'UTR (nt. 25856 a 28544). No se detectaron cambios en los virus pasados en cultivos celulares en comparación con el virus parental, lo que sugirió fuertemente que el virus rTGEV-RS-SPEDV era estable en cultivos celulares.

Con el fin de evaluar la estabilidad del virus *in vivo*, se secuenció la misma región del genoma de los virus rTGEV-SPEDV y rTGEV-RS-SPEDV, utilizando el RNA extraído del yeyuno de los animales infectados a 6 dpi. No se encontraron cambios en el genoma del virus parental rTGEV-SPEDV (datos no mostrados). En el caso del virus atenuado rTGEV-RS-SPEDV, únicamente se encontraron cambios en la zona de las TRSs duplicadas (Fig. 12). Una pequeña eliminación de secuencia y mutaciones puntuales se detectaron entre los genes E y M, que eliminaban el sitio de restricción *FseI*, pero mantenían la secuencia duplicada (Fig. 12). La secuencia insertada entre los genes M y N se eliminó completamente, revirtiendo a la secuencia del virus parental (Fig. 12). Por último, no se detectaron cambios en la secuencia entre los genes N y 7 (Fig. 12). Cabe destacar que, cuando se infectaron animales de 21 días de edad (apartado 1.4 de esta sección) y se analizó la secuencia del virus rTGEV-RS-SPEDV en muestras de heces a 7 días después de la inoculación, se detectaron los mismos cambios en el genoma del virus. Estos resultados sugerían fuertemente que el genoma del rTGEV-RS-SPEDV recuperado de los lechones representaba la evolución del virus *in vivo*. Cabe destacar que la atenuación del virus TGEV con las tres duplicaciones de TRSs es similar a la que presenta el virus que únicamente contiene la duplicación entre los genes N y 7 (Ortego, J., y col., 2003), lo que sugería que el rTGEV-RS-SPEDV evolucionado *in vivo* estaba también atenuado.



**Figura 12. Estabilidad genética del virus rTGEV-RS-SPEDV.** Se extrajo el RNA total del intestino de los lechones de cinco días de edad infectados con el virus rTGEV-RS-SPEDV (apartado 1.2 de esta sección). El virus se detectó mediante RT-PCR específica y las bandas obtenidas de secuenciaron. Las modificaciones introducidas en el genoma del virus rTGEV-RS-SPEDV se muestran como en la Fig. 7C. Los cambios observados a 6 dpi se muestran en rojo. Los guiones indican eliminación de un nucleótido, las letras en rojo indican mutaciones puntuales y la caja bordeada en rojo indica una eliminación completa de la secuencia.

#### 1.4. Protección conferida por el virus rTGEV-RS-SPEDV frente a la infección por PEDV

El virus PEDV infecta cerdos de todas las edades, pero la gravedad de los signos clínicos es inversamente proporcional a la edad de los animales (Lin, C. M., y col., 2016). Las cerdas preñadas son el modelo óptimo para evaluar la protección de los candidatos a vacuna, dado que los animales objetivo de la protección son los lechones recién nacidos y que la inmunidad lactogénica es fundamental para la protección (Langel, S. N., y col., 2016). El problema de este modelo animal es su disponibilidad, su coste y la cantidad de recursos necesarios para el cuidado de los animales, lo que limita su uso en los ensayos preliminares de candidatos a vacuna (Crawford, K., y col., 2016; Lee, S. H., y col., 2018). Por ello, se ha

## Resultados

propuesto el uso de cerdos jóvenes como modelo para los ensayos preliminares de eficacia de los candidatos a vacuna (Crawford, K., y col., 2016). De acuerdo con estas consideraciones, se usaron lechones de 21 días de edad para evaluar la protección conferida por el virus rTGEV-RS-SPEDV (Tabla 7).

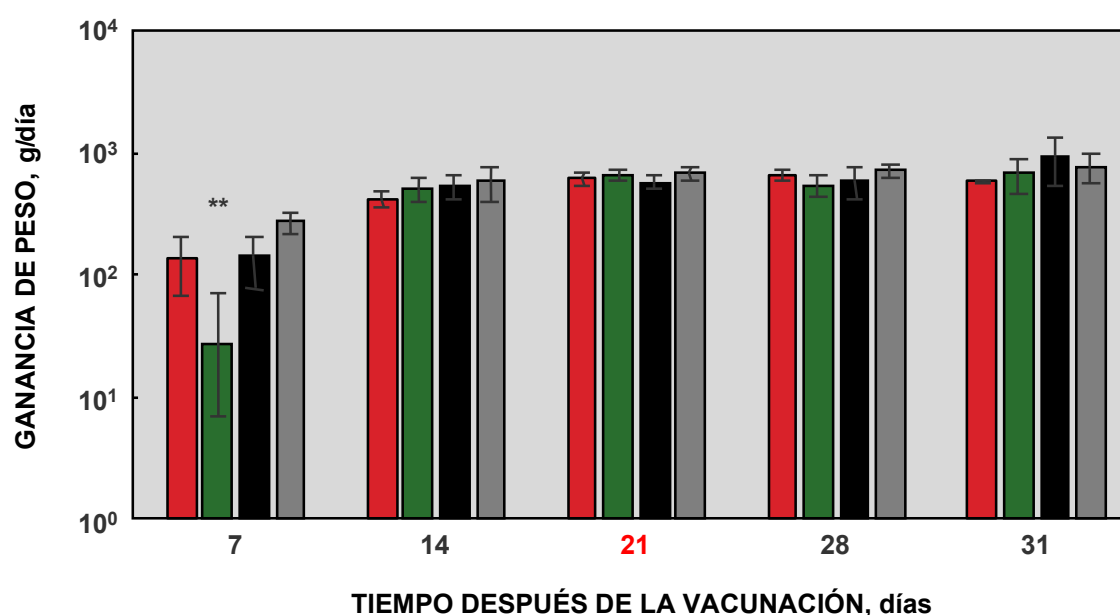
**Tabla 7. Grupos de animales en el ensayo de protección.** Animales de 21 días de edad fueron asignados de forma aleatoria a cuatro grupos diferentes.

GRUPO	VACUNACIÓN <sup>(a)</sup>	DESAFÍO <sup>(b)</sup>
1	rTGEV-RS-SPEDV	rPEDV-CM1
2	PEDV-NVSL	rPEDV-CM1
3	No inoculados	rPEDV-CM1
4	No inoculados	No inoculados

(a) Inoculación oral con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal

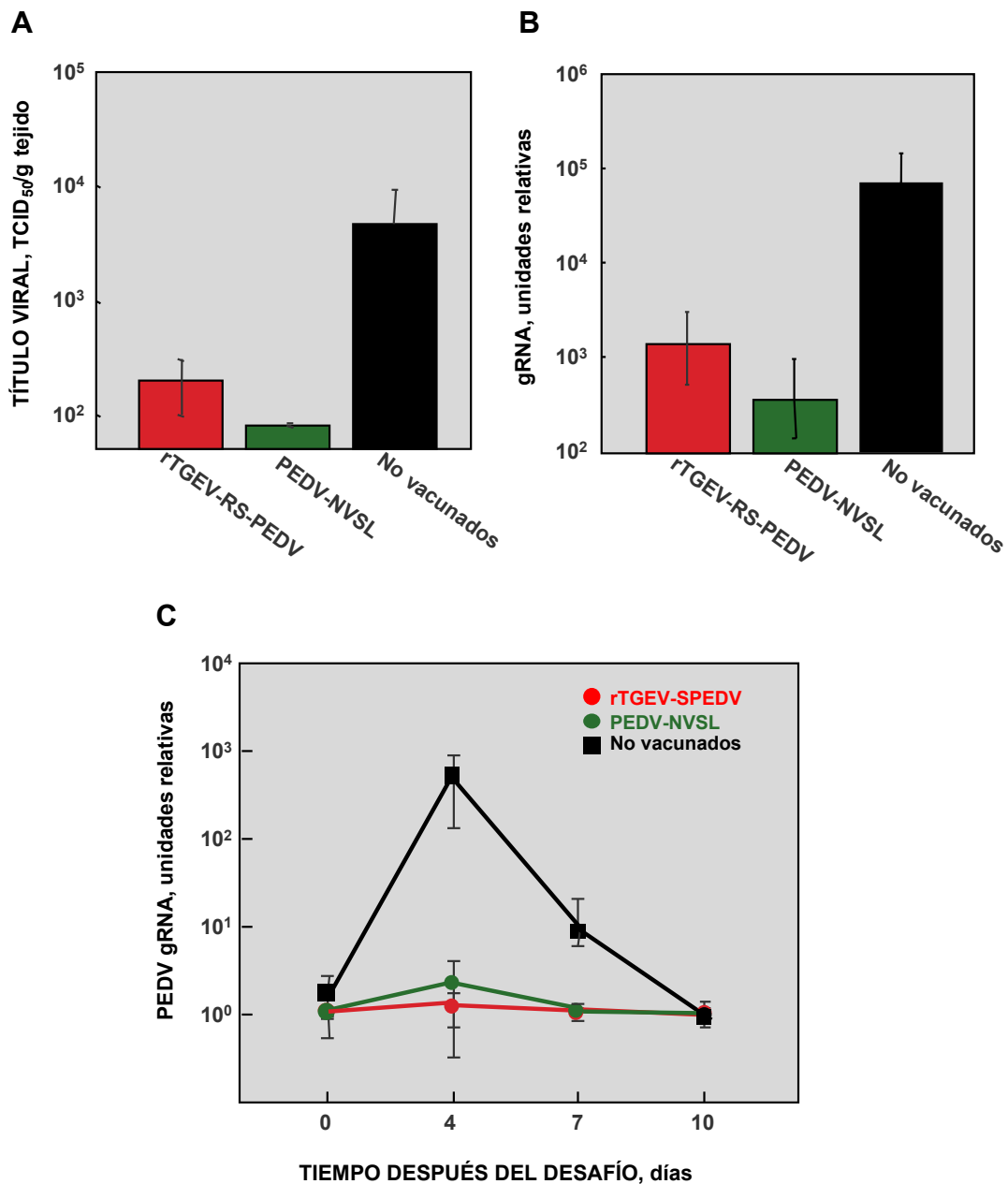
(b) 21 días después de la vacunación. Inoculación oral con  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/animal

Tanto después de la vacunación como después del desafío, los animales no mostraron signos clínicos de enfermedad entérica, tales como diarrea, vómitos o deshidratación (datos no mostrados), como se esperaba debido a la edad de los lechones. Sin embargo, cabe destacar que los animales vacunados con la cepa virulenta PEDV-NVSL mostraron un retraso en la ganancia de peso en comparación con los animales no inoculados y con los vacunados con el virus rTGEV-RS-SPEDV (Fig. 13). Resultados similares han sido descritos para otros aislados americanos virulentos (Lin, C. M., y col., 2019). Estos datos indicaron que el virus rTGEV-RS-SPEDV también estaba atenuado en animales de 21 días de edad.



**Figura 13. Ganancia de peso en animales vacunados.** Animales de 3 semanas de edad fueron divididos en 4 grupos (Tabla 7). Dos de los grupos se vacunaron con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal de rTGEV-RS-SPEDV (rojo) o PEDV-NVSL (verde). Tres semanas después de la vacunación (21 dpv, indicado en rojo), los animales no vacunados o no fueron infectados (gris) o fueron desafiados con  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/animal del rPEDV-CM1 virulento (negro). Los animales vacunados fueron desafiados también con la misma dosis que los no vacunados. Los signos clínicos y el peso se observaron diariamente después de la vacunación y el desafío, y una vez a la semana durante el resto del experimento. Los valores representan la media de seis animales diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar para cada dato. p-valor, \*\*<0.01.

Se evaluaron los títulos virales en el yeyuno de los animales desafiados. El virus del desafío replicó eficientemente en el intestino de los animales no vacunados (Fig. 14A). Por el contrario, los títulos virales en los intestinos de los animales vacunados con el rTGEV-RS-SPEDV y PEDV-NVSL eran de 25 a 50 veces menores, respectivamente (Fig. 14A). Se obtuvieron datos similares en la acumulación de gRNA viral, con una disminución de hasta 200 veces en los animales vacunados frente a los no vacunados (Fig. 14B). Además, cabe destacar que sólo los animales no vacunados dispersaron virus en las heces después del desafío (Fig. 14C). En conjunto, estos datos indicaron que el virus del desafío no infectó eficientemente a los animales vacunados. Es más, los resultados indicaron que el virus rTGEV-RS-SPEDV protegió frente al desafío con el virus virulento rPEDV-CM1.



**Figura 14. Título viral de PEDV en el tracto entérico de los animales vacunados.** Cuatro días después del desafío con una cepa de PEDV virulenta, las muestras de intestino de tres animales distintos se procesaron y titularon en células Vero (A) o se analizaron mediante RT-qPCR (B). Además, la carga viral en las heces se analizó mediante RT-qPCR (C). Se representan los valores para los animales vacunados con rTGEV-RS-SPEDV (rojo), animales vacunados con la cepa virulenta PEDV-NVSL (verde) o animales no vacunados y desafiados (negro). Las barras de error indican la desviación estándar para cada valor.

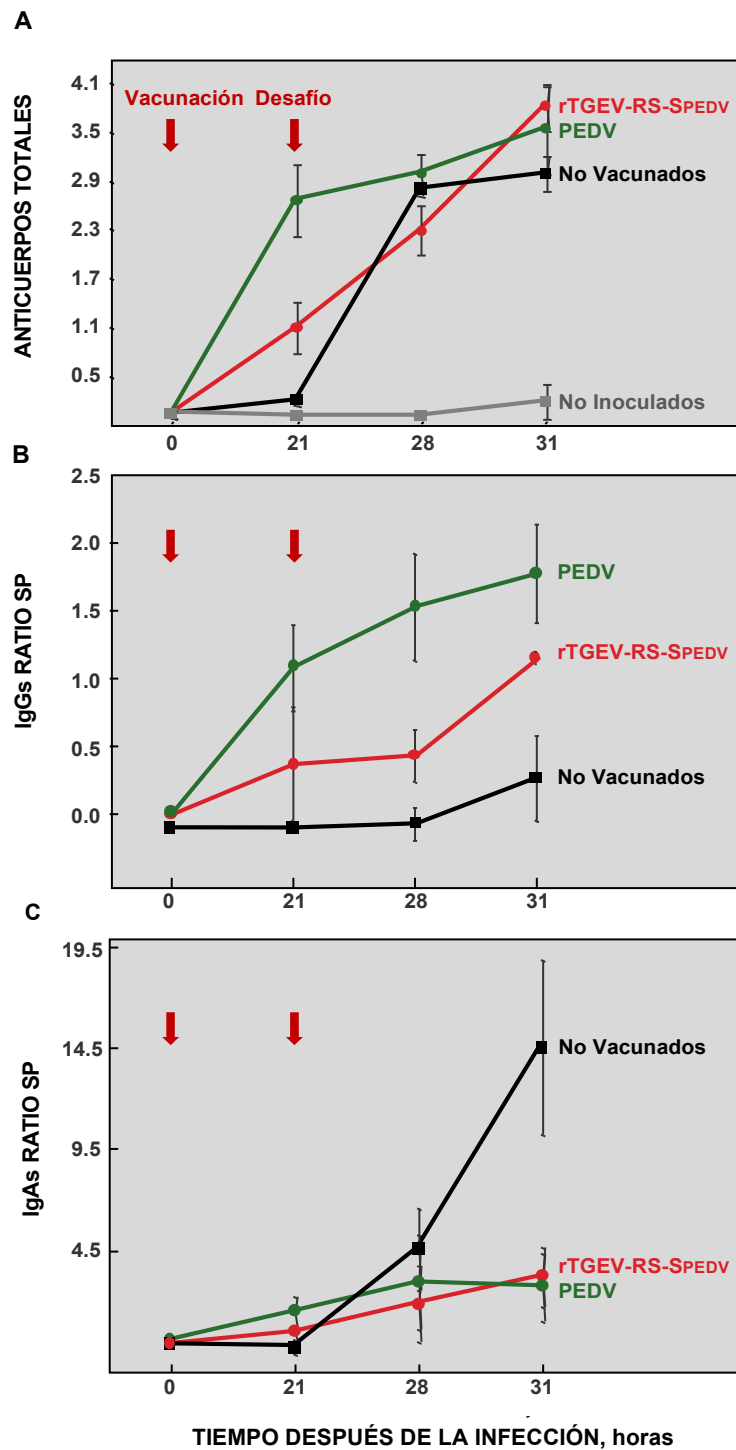
### 1.5. Respuesta humoral inducida por el virus rTGEV-RS-SPEDV

Se evaluó la respuesta de anticuerpos específica para PEDV analizando el suero de animales vacunados y no vacunados. Antes del desafío (21 dpv), todos los

animales vacunados presentaron anticuerpos contra el PEDV. Los niveles eran superiores en los animales vacunados con el virus PEDV-NVSL que en los vacunados con el virus rTGEV-RS-SPEDV (Fig. 15A). Este resultado era de esperar, ya que el ELISA se desarrolló frente al PEDV completo y el virus quimérico rTGEV-RS-SPEDV sólo expresaba la proteína S de PEDV. Después del desafío, los anticuerpos contra PEDV aumentaron en todos los grupos desafiados (Fig. 15A). Curiosamente, este incremento fue menor en los animales vacunados, de acuerdo con una disminución de la replicación del virus del desafío en esos animales.

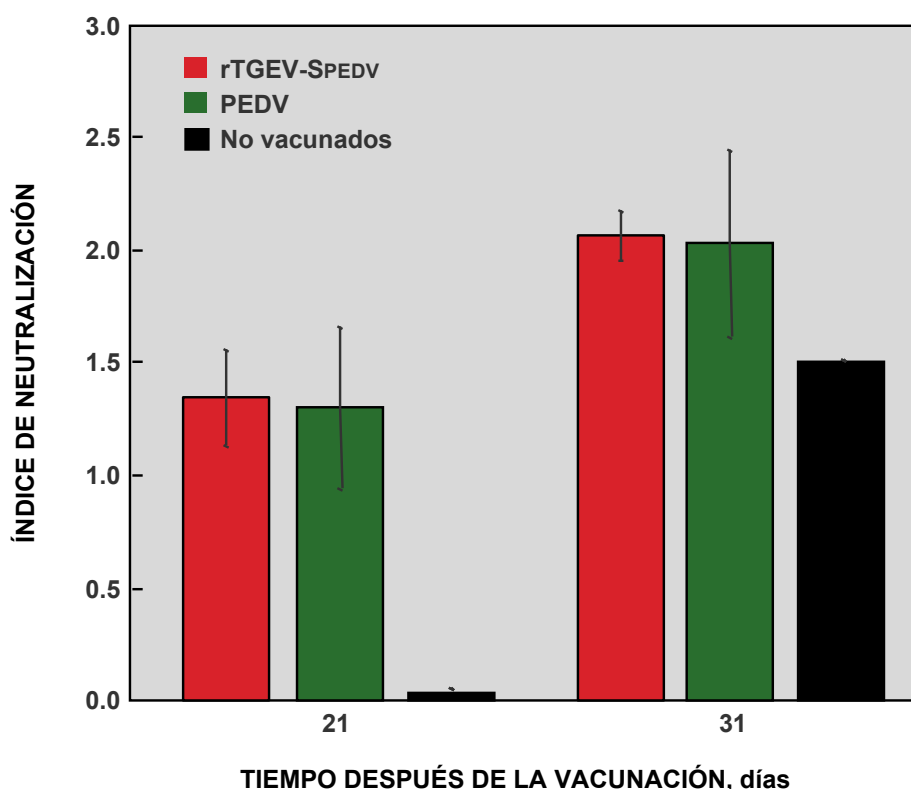
Los niveles de IgGs (Fig. 15B) e IgAs específicas para PEDV (Fig. 15C) también se analizaron, mostrando resultados similares a los del resto de anticuerpos contra PEDV. Se ha demostrado que la protección contra la infección por PEDV está relacionada con los niveles de IgA (Annamalai, T., y col., 2017; Hain, K. S., y col., 2016; Opriessnig, T., y col., 2017b; Poonsuk, K., y col., 2016). Es importante puntualizar que los niveles de IgA en el suero de animales vacunados después del desafío se vieron reducidos significativamente en comparación con los niveles en los sueros de animales no vacunados (Fig. 15C). Esto sugirió que el virus del desafío no provocaba una respuesta fuerte de IgAs en el intestino de los animales vacunados, probablemente debido a una disminución en su replicación en el tracto entérico, correlacionando con la protección observada.





**Figura 15. Respuesta humoral inducida en animales vacunados.** Se tomaron muestras de suero de animales vacunados y no vacunados a diferentes tiempos después de la inoculación. Los días de vacunación y desafío se indican con flechas rojas. Se detectaron anticuerpos específicos para PEDV mediante ELISA: anticuerpos totales (A), IgGs (B) e IgAs (C). Los sueros se tomaron de animales no vacunados y no desafiados (gris), de animales no vacunados y desafiados (negro) y de animales vacunados con el PEDV-NVSL (verde) o con el virus rTGEV-RS-SPEDV (rojo). Los valores representan la media de, al menos, tres animales diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar para cada valor.

También se evaluó la capacidad de neutralización de los anticuerpos inducidos. Como se esperaba, en los animales no vacunados sólo se detectaron anticuerpos neutralizantes después del desafío (Fig. 16). Por el contrario, en los animales vacunados, tanto con el virus PEDV-NVSL como con el virus rTGEV-RS-SPEDV, se detectaron niveles significativos de anticuerpos neutralizantes antes del desafío, que aumentaron levemente después del desafío (Fig. 16).



**Figura 16. Anticuerpos neutralizantes en los animales vacunados.** El ensayo de neutralización se llevó a cabo usando muestras de sueros de animales vacunados con rTGEV-RS-SPEDV (rojo) o el PEDV-NVSL (verde) y de animales no vacunados y desafiados (negro). Los sueros se tomaron antes (21 dpv) o después (31 dpv) del desafío. Los valores indican la media de los índices de neutralización obtenidos con los sueros de, al menos, tres animales distintos. Las barras de error representan la desviación estándar para cada valor.

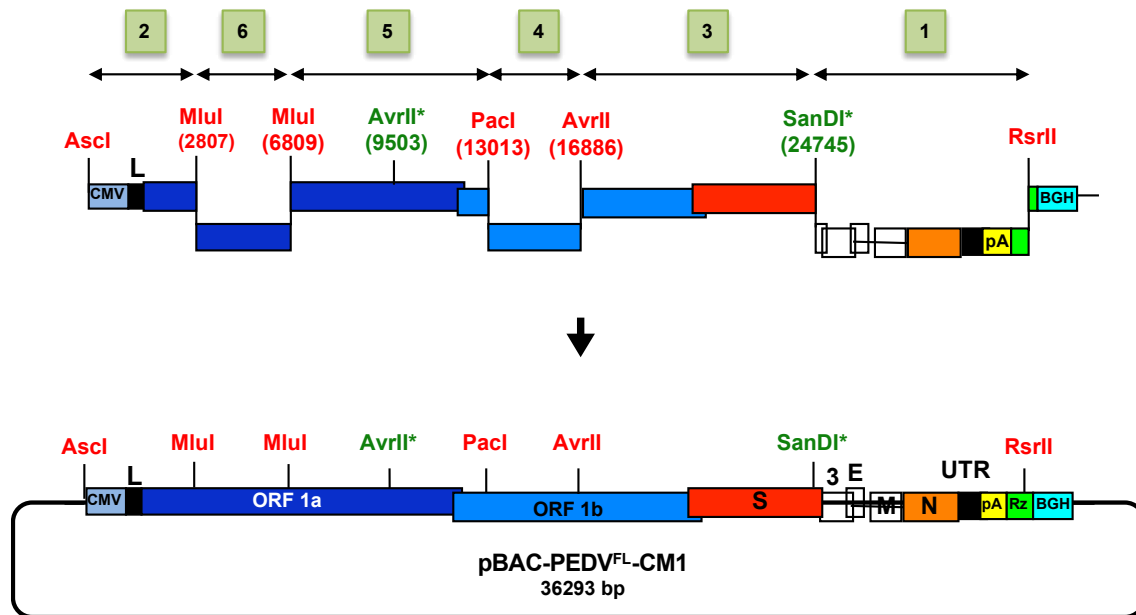
En su conjunto, los datos obtenidos demostraron que el rTGEV-RS-SPEDV confirió protección contra la infección por PEDV y podía ser el punto de partida para un candidato a vacuna eficaz.

## **2. GENERACIÓN DE UN CLON INFECTIVO DE PEDV**

### **2.1. Ensamblaje del cDNA de PEDV en un BAC**

Con el avance que han supuesto las técnicas de secuenciación masiva, el número de genomas de PEDV en las bases de datos ha crecido exponencialmente desde 2012. El 70% de estas secuencias provienen de muestras biológicas y no de virus aislados. Se ha estimado que sólo entre el 2% y el 12% de los virus PEDV de campo se pueden aislar a partir de muestras biológicas (Oka, T., y col., 2014). Además, el pase de virus PEDV en células Vero, utilizadas para el aislamiento y crecimiento viral, introduce mutaciones en el genoma de PEDV que disminuyen la capacidad de infectar el intestino del cerdo (Chen, Q., y col., 2015; Li, Y., y col., 2017; Lin, C. M., y col., 2017). Estas consideraciones se tuvieron en cuenta para generar un clon infectivo que diera lugar a un virus PEDV recombinante virulento y, por ello, se seleccionó el genoma de la cepa de PEDV USA/Iowa/18984/2013 (GenBank KF804028). Este virus crece eficientemente en cultivos celulares (Hoang, H., y col., 2013) y es virulento en lechones de varias edades, incluso después de su propagación en cultivos celulares (Madson, D. M., y col., 2016; Madson, D. M., y col., 2014).

Para el ensamblaje del cDNA infectivo se seleccionaron sitios únicos de restricción, que dividían el genoma de PEDV en seis fragmentos (Fig. 17). Además, se introdujeron dos mutaciones silenciosas (C9503>T y T24745>C) que eliminaban o creaban sitios de restricción, respectivamente, y que se usaron como marcadores genéticos (Fig.17). Los seis fragmentos se ensamblaron secuencialmente en un BAC, obteniéndose el clon infectivo pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-CM1 (Fig.17).



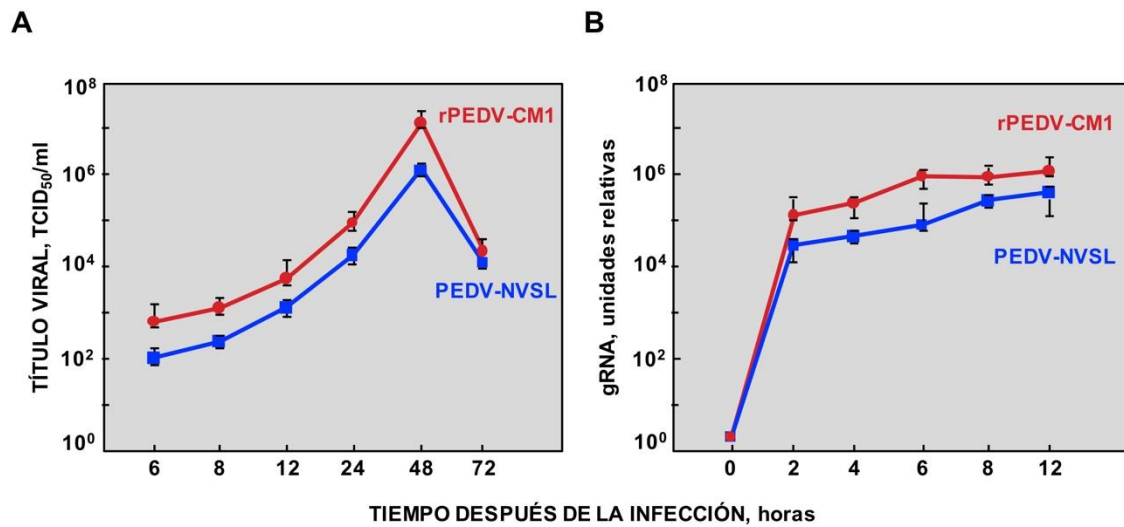
**Figura 17. Ensamblaje del clon infeccioso de PEDV.** En la parte superior se muestra el esquema del genoma del PEDV, indicando en rojo los sitios de restricción seleccionados para el ensamblaje. En verde se muestran los dos marcadores genéticos introducidos: el primero eliminó un sitio *AvrII* (C9503>T) y el segundo generó el sitio *SanDI* (T24745>C) utilizado en el ensamblaje del cDNA infeccioso. Los números indican las posiciones en el genoma del PEDV. Los cuadros verdes indican los 6 fragmentos en que se dividió el genoma, así como el orden en el que se ensamblaron. En la parte inferior se muestra el esquema del clon infeccioso pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-CM1. Las letras dentro de las barras indican los genes virales. CMV, promotor de citomegalovirus; UTR, región no traducida; pA, poli-A; Rz, ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV); BGH, secuencias de terminación y poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino.

## 2.2. Rescate del virus recombinante rPEDV-CM1 y caracterización en cultivos celulares

Se rescató el virus recombinante rPEDV-CM1 transfectando el clon infeccioso pBAC-PEDV<sup>FL</sup>-CM1 en células Vero. El virus rPEDV-CM1 mostró un título de  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml y causó un efecto citopático consistente en la formación de sincitios, característico del PEDV. Los títulos virales (Fig. 18A) y la acumulación de RNA genómico (Fig. 18B) en cultivos celulares fueron entre 5 y 10 veces superiores a los del virus americano virulento usado como control (PEDV-NVSL). Cabe señalar que el virus PEDV-NVSL (GenBank KF267450) se diferencia del virus PEDV USA/Iowa/18984/2013, en el que se basó el cDNA infeccioso, en 15 mutaciones que dan lugar a cambios de aminoácido en las proteínas nsp2, nsp3,

## Resultados

nsp9 y S. Estos cambios podrían explicar las pequeñas diferencias en el crecimiento en cultivos celulares de los virus rPEDV-CM1 y PEDV-NVSL.

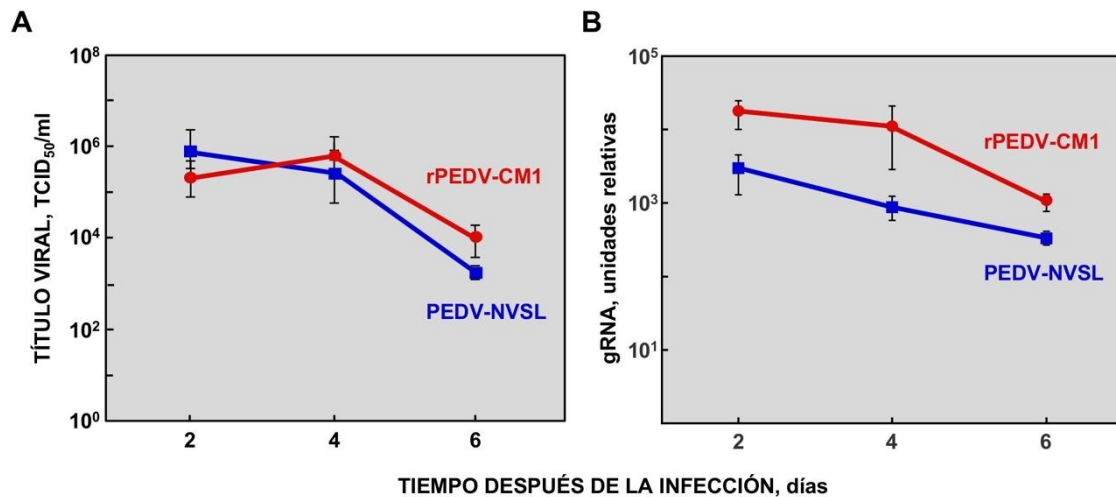


**Figura 18. Cinética de crecimiento del virus rPEDV-CM1.** Se infectaron células Vero a una moi de 0.01 con los virus rPEDV-CM1 (rojo) y PEDV-NVSL (azul) como control. Se analizó el título viral (A) y la acumulación de gRNA viral (B) a distintos tiempos después de la infección. Los datos representan la media de tres infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

Estos resultados mostraron que el virus recombinante rPEDV-CM1, rescatado a partir del cDNA infectivo, se comportaba en cultivos celulares de forma similar a un virus epidémico PEDV virulento.

### 2.3. Virulencia del virus rPEDV-CM1

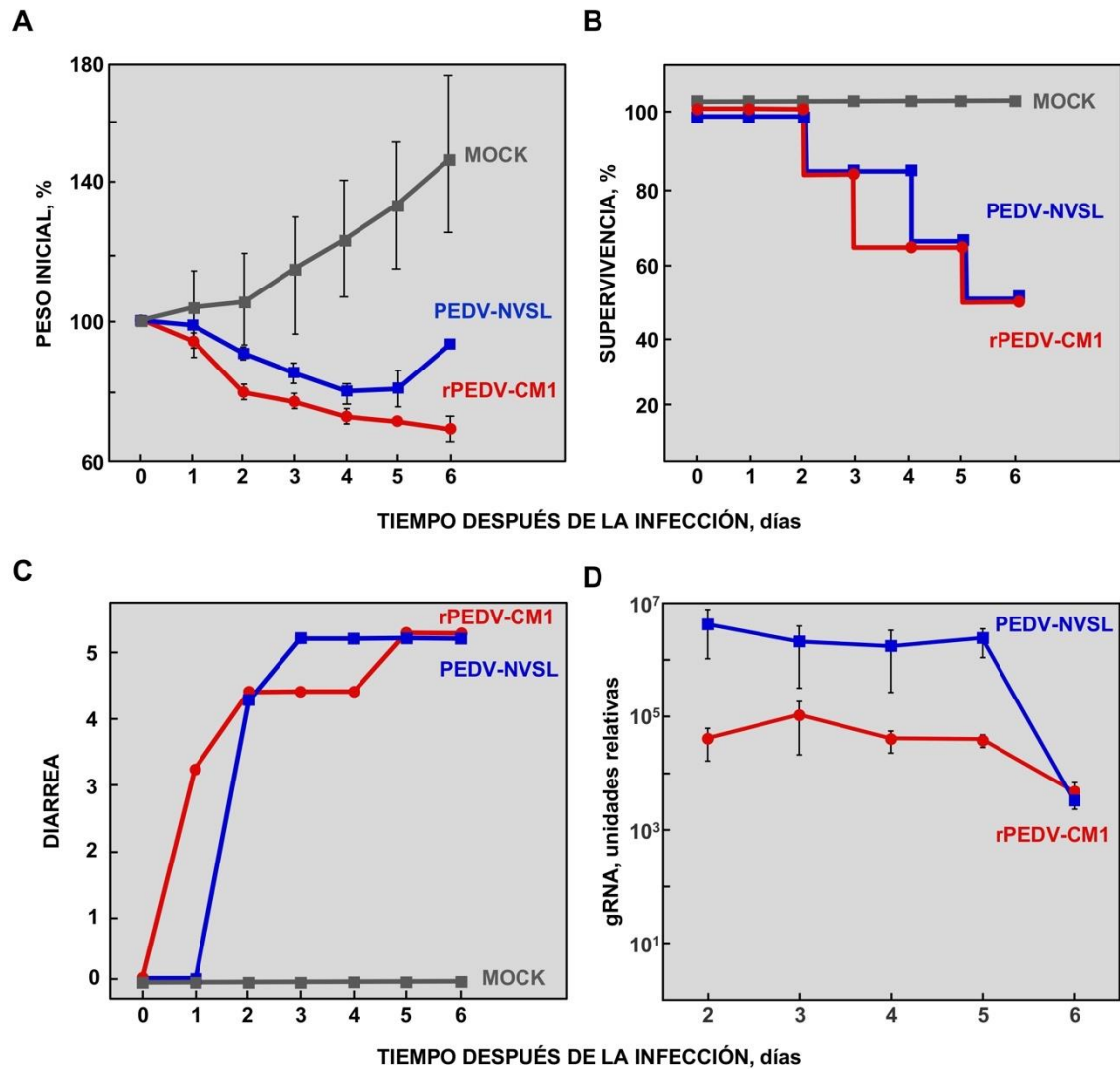
La patogénesis producida por el rPEDV-CM1 se analizó en lechones de cinco días de edad inoculados con 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/animal. El virus recombinante rPEDV-CM1 alcanzó títulos de 1x10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/g de tejido en el intestino de los lechones infectados (Fig. 19A). Este título fue similar al obtenido en los animales infectados con el virus control PEDV-NVSL (Fig. 19A). La acumulación de gRNA en el intestino de los animales infectados con el virus rPEDV-CM1 fue hasta 15 veces superior a la observada en los animales infectados con el virus control PEDV-NVSL (Fig. 19B). Estos datos indicaron que el virus rPEDV-CM1 replicaba en los tejidos diana eficientemente, tanto o más que el virus control PEDV-NVSL.



**Figura 19. Replicación del virus rPEDV-CM1 in vivo.** Se inocularon oralmente lechones de cinco días de edad con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal del virus rPEDV-CM1 (rojo) o del virus PEDV-NVSL (azul). Se analizaron el título viral (A) y la acumulación de RNA genómico (B) en el intestino de los animales a diferentes días después de la inoculación. Los datos representan la media de tres animales independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

Los lechones no inoculados no perdieron peso, no mostraron diarrea ni ningún otro signo clínico de infección entérica, y el 100% sobrevivieron (Fig. 20). En cambio, los animales infectados, tanto con el control positivo PEDV-NVSL como con el virus recombinante rPEDV-CM1, mostraron una pérdida de peso del 20% y 30%, respectivamente (Fig. 20A) y una mortalidad del 50% (Fig. 20B). Los animales infectados con ambos virus, mostraron signos clínicos de enfermedad entérica, como diarrea severa (Fig. 20C) y deshidratación. Curiosamente, la diseminación viral en las heces de los animales infectados con el virus PEDV-NVSL fue hasta 50 veces mayor que la observada en los lechones infectados con el virus rPEDV-CM1 (Fig. 20D). La acumulación del gRNA de PEDV en heces se ha utilizado en numerosos estudios como una medida de la replicación viral en el tracto entérico (Beall, A., y col., 2016);(Su, Y., y col., 2019). Nuestros resultados mostraron una diferencia entre la acumulación de gRNA en heces (Fig. 20D) y el título de virus infectivo en intestino (Fig. 19A) o la acumulación de gRNA viral en intestino (Fig. 19B), lo que sugería fuertemente que la medida de gRNA en heces no es un parámetro válido para evaluar la eficiencia de la replicación de PEDV en tracto entérico.

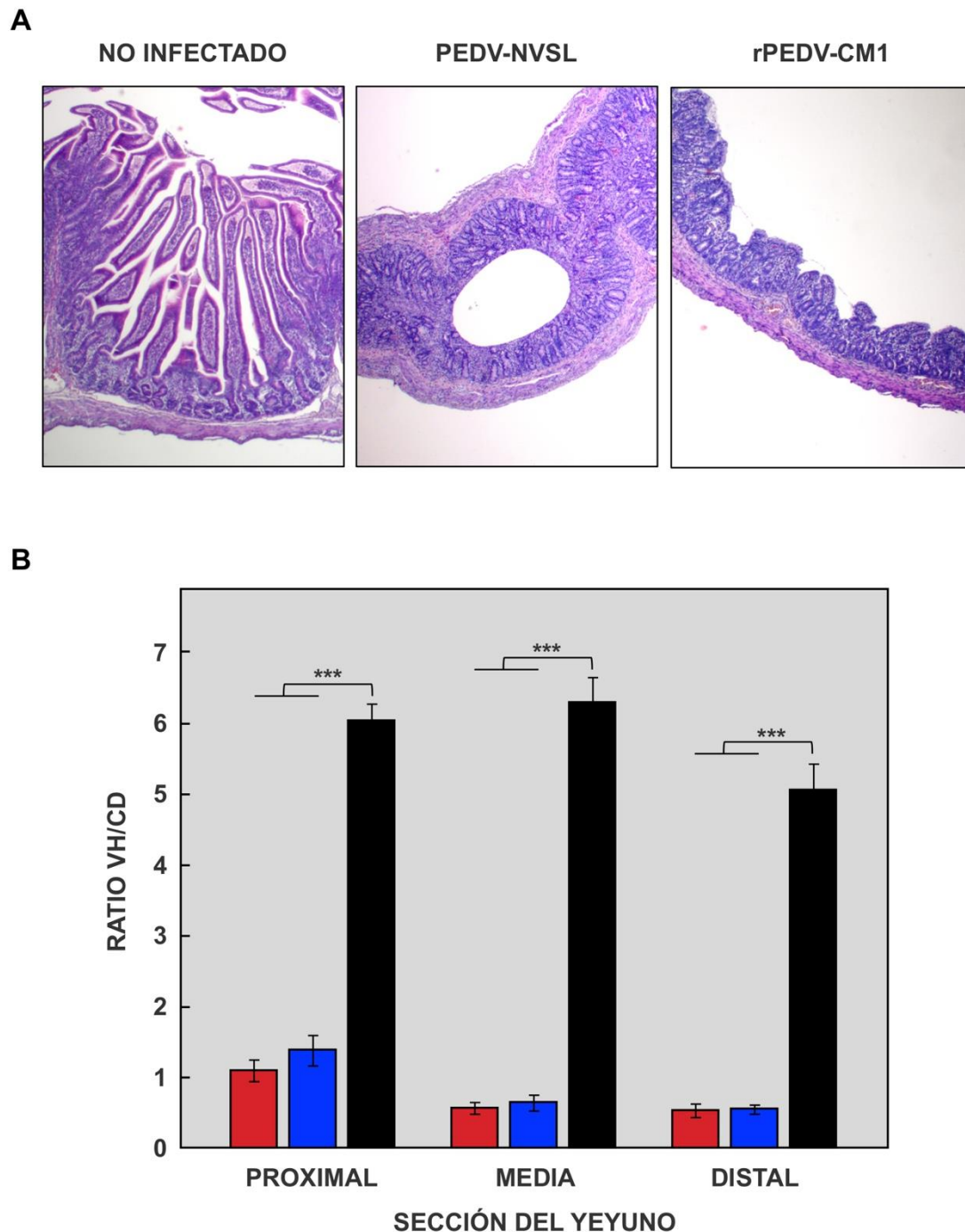
## Resultados



**Figura 20. Virulencia del rPEDV-CM1.** Se inocularon oralmente lechones de 5 días de edad con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal del virus rPEDV-CM1 (rojo) o del virus PEDV-NVSL (azul). Como control se utilizó un grupo de lechones sin inocular (MOCK, gris). Se analizaron la pérdida de peso (A), la supervivencia (B) y la diarrea (C). La carga viral en las heces se evaluó mediante RT-qPCR (D). Los datos representan la media de nueve animales independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

En el momento del sacrificio, en todos los animales infectados, el intestino delgado estaba distendido y con contenido sin digerir, los nódulos linfáticos mesentéricos inflamados y la mucosa intestinal enrojecida. De acuerdo con los signos clínicos y con las observaciones macroscópicas de los tejidos, se observó degeneración del epitelio intestinal y descamación en el yeyuno de los animales infectados, acompañado por inflamación y acortamiento de los villi (Fig. 21A). el

daño en el intestino fue similar en los animales infectados con el virus rPEDV-CM1 y con el virus PEDV-NVSL (Fig. 21B).



**Figura 21. Daño intestinal en lechones inoculados con rPEDV-CM1.** (A) Secciones representativas del yeyuno de animales no infectados, o de animales infectados con los virus rPEDV-CM1 o PEDV-NVSL, a 6 días después de la inoculación y teñidas con hematoxilina-eosina. (B) Ratio entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas (VH/CD) en muestras de intestino proximal, medio y distal a 6 días después de la inoculación. En animales no infectados (negro) o animales infectados con los virus rPEDV-CM1 (rojo) o PEDV-NVSL (azul).



## Resultados

Los datos representan la media de tres animales independientes y de dos campos microscópicos por sección. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso. p-valor, \*\*\*<0.001.

En conjunto, los resultados indicaron que el virus recombinante rPEDV-CM1, obtenido a partir del cDNA infeccioso era, como se esperaba, virulento.

### 3. DESARROLLO DE UNA VACUNA VIVA ATENUADA BASADA EN EL CLON INFECCIOSO DE PEDV

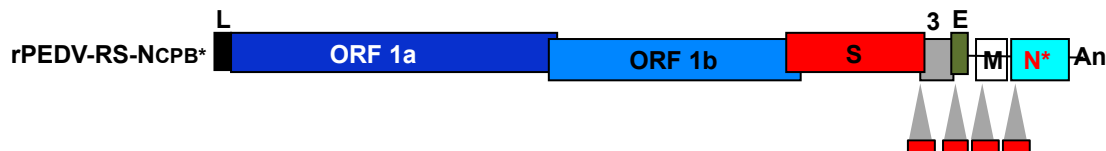
El cDNA de PEDV, que daba lugar a un virus virulento, es una herramienta imprescindible para el diseño de vacunas vivas atenuadas, así como para comprender los mecanismos de patogénesis de PEDV. Como parte de los objetivos de esta tesis, el cDNA infeccioso se utilizó para el diseño de un virus candidato a vacuna, que conservase un equilibrio adecuado entre replicación in vivo y atenuación de la patogénesis. Para ello, se seleccionaron varias estrategias de atenuación (Fig. 22), que se desarrollarán en los siguientes apartados de esta sección:

- Recodificación del sesgo de los pares de codones (CPB) del gen N (NCPB)
- Duplicación de las TRSs
- Eliminación de secuencias cortas en el gen E

#### ESTRATEGIA 1: recodificación del gen N (CPB)



#### ESTRATEGIA 2: duplicación TRSs



#### ESTRATEGIA 3: eliminación de secuencias cortas en el gen de la proteína E



Figura 22. Estrategias de atenuación seleccionadas para el diseño del candidato a vacuna basado en el virus rPEDV-CM1. En el esquema superior se representa el diseño del mutante

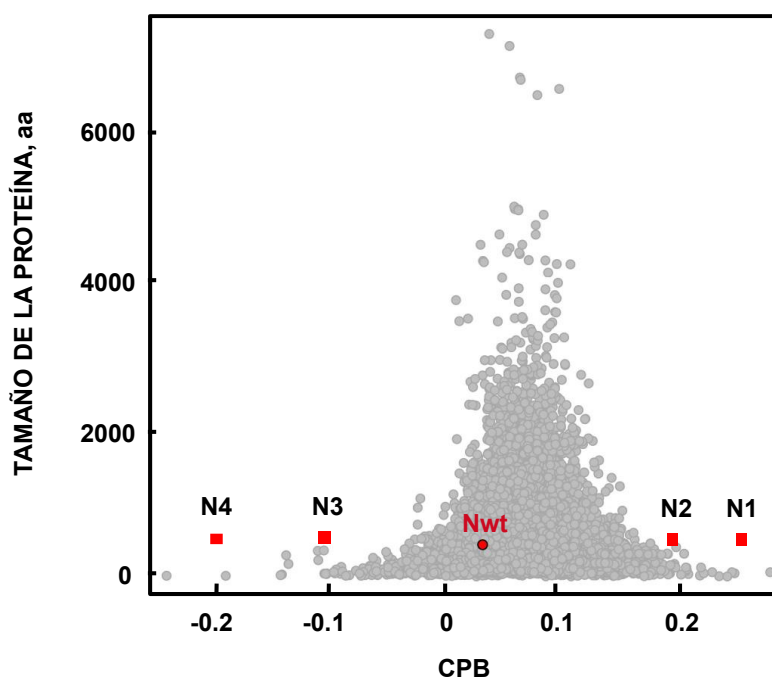
usando la estrategia del cambio del CPB en el gen N del PEDV. N\*, N mutante con recodificación del CPB. En medio, se representa el diseño del mutante con las duplicaciones de las TRS de los genes 3, E, M y N (rectángulos rojos). En el esquema inferior se indica la estrategia basada en pequeñas eliminaciones de secuencia en el gen E. Las letras dentro de las cajas indican los genes virales. L, secuencia líder; An, cola de poliadenina.

### 3.1 Generación de virus rPEDV con cambios en el CPB del gen N

#### 3.1.1. Diseño de mutantes NCPB de PEDV

Para cada gen, la posición de los pares de codones está preestablecida. Este fenómeno se denomina sesgo en los pares de codones (CPB) y es característico de cada gen y de cada especie. Se ha descrito que, en el caso de los virus, el diseño de secuencias sintéticas que modifican el CPB de un gen cambiando el orden de codones sinónimos y, por tanto, sin modificar la secuencia de la proteína, resulta en la atenuación del virus (Coleman, J. R., y col., 2008a).

Debido a que en CoVs la proteína N es esencial para el virus y está implicada en la interacción virus-huésped (Almazan, F., y col., 2004; Surjit, M., y col., 2006), se decidió aplicar el cambio en el CPB al gen que codifica para la proteína N de PEDV. Para ello, se diseñaron cuatro secuencias mutantes: dos de ellas (N1, N2) con un CPB superior al gen parental y las otras dos (N3, N4) con un CPB inferior (Fig. 23).



**Figura 23. CPB para los genes porcinos.** Se calculó el CPB de cada uno de los 30585 genes de cerdo (ENSEMBL *release* 84) y del gen N de la cepa de PEDV USA/Iowa/18984/2013 (Nwt,

## Resultados

en rojo). Cada punto gris indica el CPB de un gen porcino representado frente al tamaño de la proteína que codifica. Los cuadros rojos representan las secuencias mutantes diseñadas.

Las secuencias sintéticas diseñadas contenían entre 118 y 280 mutaciones puntuales silenciosas (Tabla 8). Se ha descrito que el cambio en el CPB de un gen afecta también a la frecuencia de pares de dinucleótidos xxCpGxx y xxUpAxx, lo que, a su vez, influye en la respuesta inmune innata y la estabilidad del RNA (Tulloch, F., y col., 2014). Las secuencias mutantes N1 y N2 disminuyeron la frecuencia de dinucleótidos comparada con la del gen parental (Tabla 8), mientras que las secuencias N3 y N4 la aumentaron (Tabla 8).

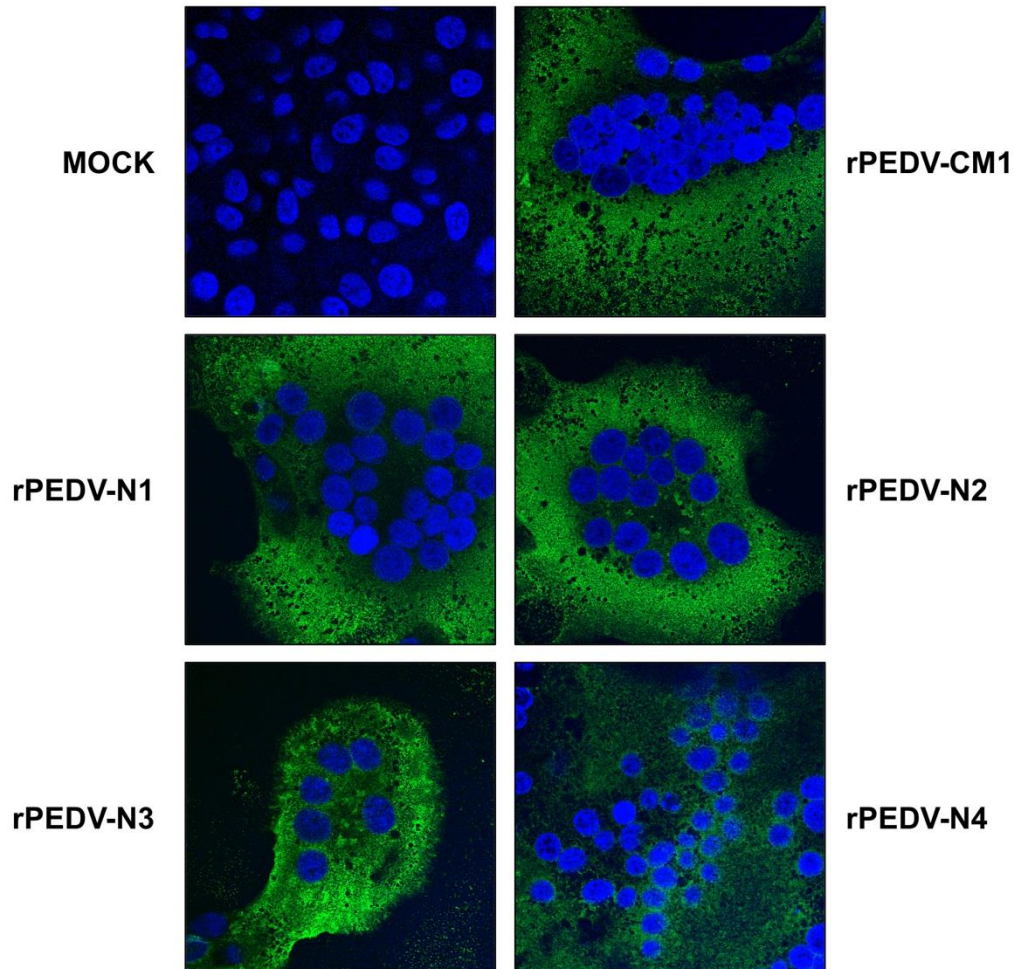
**Tabla 8. Características de los mutantes NCPB.** Resumen de los cambios introducidos en los mutantes CPB seleccionados.

GEN	CPB	MUTACIONES	FRECUENCIA %	
			xxCpGxx	xxUpAxx
Nwt	0.03	-	8.64	17.27
N1	0.25	280	0.91	6.82
N2	0.20	191	3.18	7.73
N3	- 0.10	118	17.27	22.27
N4	- 0.20	221	23.64	26.36

Las secuencias sintéticas diseñadas se clonaron en el cDNA infeccioso de PEDV, sustituyendo el gen de la N parental, obteniéndose los cuatro clones infecciosos correspondientes (apartado 5.3. de Materiales y Métodos).

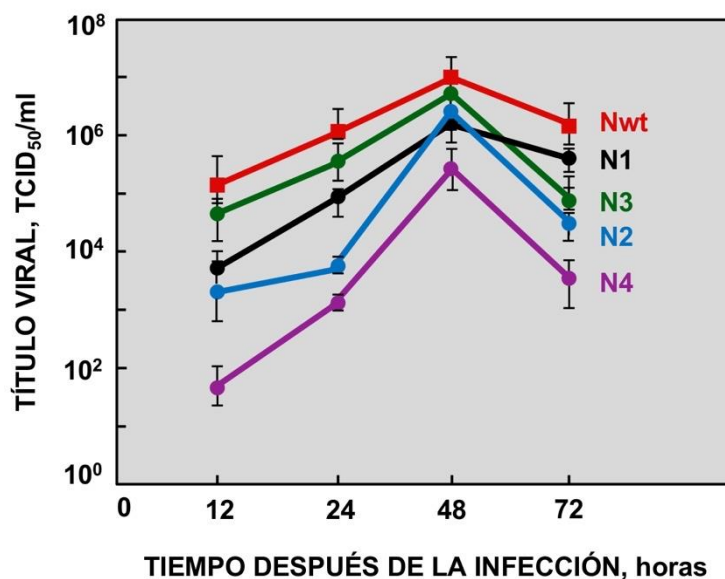
### 3.1.2. Caracterización *in vitro* de los virus mutantes rPEDV-NCPB

Los virus mutantes rPEDV-N1, rPEDV-N2, rPEDV-N3 y rPEDV-N4 fueron rescatados en células Vero a partir de los clones infecciosos correspondientes. Todos los causaron un efecto citopático similar al del virus parental rPEDV-CM1, con formación de sincitios, aunque el mutante rPEDV-N4 mostró cierto retraso (Fig. 24).



**Figura 24. Efecto citopático en células infectadas con los virus mutantes rPEDV-NCPB.** Se infectaron células Vero a una moi de 0.01 con el virus parental rPEDV-CM1 y los virus mutantes rPEDV-N1, rPEDV-N2, rPEDV-N3 y rPEDV-N4. Las células no infectadas (Mock) o infectadas se fijaron a 48 hpi, y la proteína N se marcó con un anticuerpo específico (verde).

Los mutantes rPEDV-N1 y rPEDV-N3 presentaron cinéticas de crecimiento similares al virus parental, aunque con títulos máximos ligeramente inferiores (Fig. 25). en cambio, los mutantes rPEDV-N2 y rPEDV-N4 presentaron un retraso en el crecimiento, alcanzando el virus rPEDV-N2 títulos máximos similares al virus parental, mientras que los títulos del virus rPEDV-N4 fueron 100 veces menores (Fig. 25).

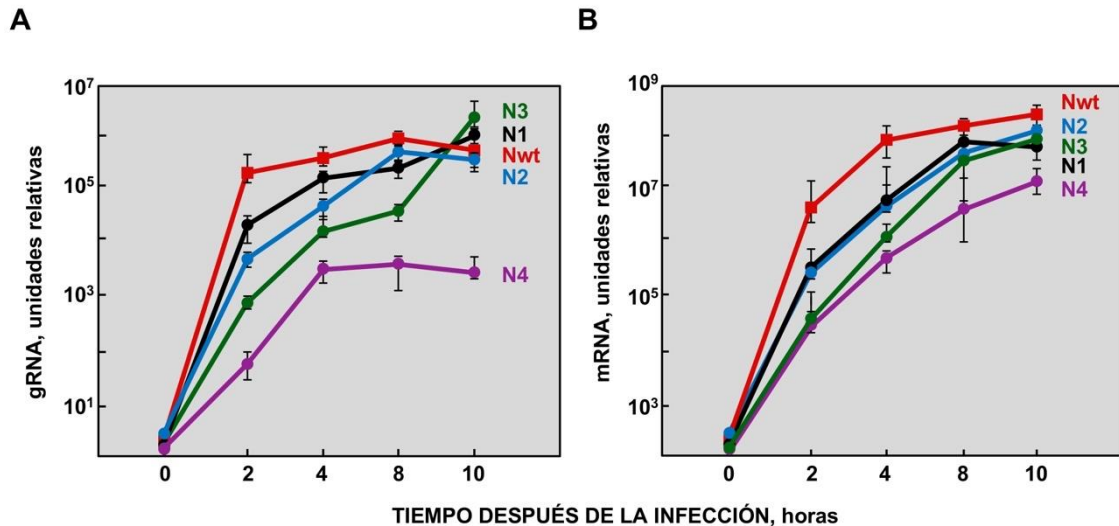


**Figura 25. Cinéticas de crecimiento de los virus mutantes rPEDV-NCPB en cultivos celulares.** Se infectaron células Vero a una moi de 0.01 con el virus parental rPEDV-CM1 (Nwt, rojo) y los virus mutantes rPEDV-N1 (N1, negro), rPEDV-N2 (N2, azul), rPEDV-N3 (N3, verde) y rPEDV-N4 (N4, morado). Se analizó el título viral a los tiempos indicados después de la infección. Los datos representan la media de tres infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

Debido a que la proteína N tiene un papel muy relevante en la síntesis de RNA viral, se analizaron la replicación (Fig. 26A) y la transcripción (Fig. 26B) de los mutantes rPEDV-NCPB, evaluando mediante RT-qPCR la acumulación de gRNA y sgRNA-M, respectivamente. Los virus rPEDV-N1 y rPEDV-N2 replicaron y transcribieron de modo similar al virus parental rPEDV-CM1 (Fig. 26). El virus rPEDV-N3 presentó un retraso tanto en replicación (Fig. 26A) como en transcripción (Fig. 26B), alcanzando, entre 8 y 10 hpi, los niveles de RNA viral del virus parental. Por último, en las células infectadas con el virus rPEDV-N4 se detectaron niveles significativamente menores, de entre 100 y 1000 veces, de gRNA (Fig. 26A) y sgRNA (Fig. 26B) comparados con los observados en las células infectadas con el virus parental.

El cambio en la secuencia del gen de la N podría dar lugar al uso de TRSs alternativas y, por tanto, a la síntesis de sgRNAs alternativos que estuviesen influyendo la expresión de otros genes virales, incluido el de la N (Zuniga, S., y col., 2004). De hecho, los genes mutantes N3 y N4 contenían un hexanucleótido CUAAC, de se ha demostrado en esta tesis que forma parte de la TRS del gen

N (apartado 3.2.1 de esta sección). Los análisis de RT-PCR realizados descartaron la síntesis de sgRNAs alternativos en células infectadas con cualquiera de los mutantes rPEDV-NCPB, incluidos los mutantes rPEDV-N3 y rPEDV-N4 (datos no mostrados).

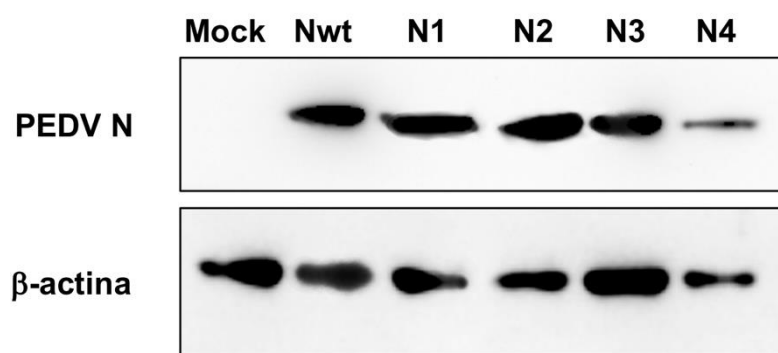


**Figura 26. Análisis de la síntesis de RNA viral de los mutantes rPEDV-NCPB en cultivos celulares.** Se infectaron células Vero a una moi de 1 con el virus parental rPEDV-CM1 (Nwt, rojo) y los virus mutantes rPEDV-N1 (N1, negro), rPEDV-N2 (N2, azul), rPEDV-N3 (N3, verde) y rPEDV-N4 (N4, morado). Se analizaron, mediante RT-qPCR, la replicación (A) y la transcripción viral (B) a los tiempos indicados después de la infección. Los datos representan la media de tres infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

Estos datos indicaron que los cambios en el CPB del gen N de PEDV afectaron distintos aspectos del ciclo viral. Especialmente, en el virus mutante rPEDV-N4, los cambios en el gen N causaron una disminución significativa en la síntesis de RNA viral, que correlacionó con un título viral menor que el del virus parental. Cabe destacar que, como se ha descrito anteriormente, los cambios en el CPB del gen N no modificaron la secuencia de la proteína N. Sin embargo, podrían afectar a la cinética de acumulación de la proteína, tal como se ha descrito en otros sistemas (Mueller, S., y col., 2010b). Al analizar mediante *Western-blot* la acumulación de la proteína N en células infectadas, no se observaron diferencias significativas entre los mutantes y el virus parental (datos no mostrados y Fig. 27), excepto una disminución en la cantidad de la proteína N en el caso de las células infectadas con el virus rPEDV-N4 (Fig. 27). Resultados similares se han descrito en el caso de mutantes en el CPB de varios genes de DENV (Stauff, C.

## Resultados

B., y col., 2018). Sin embargo, no se podía descartar que las diferencias en los títulos virales y en la síntesis de RNA viral en cada uno de los mutantes estuviesen afectando a la acumulación de proteína N. Para analizar cómo el efecto del cambio en el CPB afectaba específicamente a la proteína N, se intentó detectar la acumulación de varias nsps virales. Se testaron anticuerpos específicos para las proteínas nsp2, nps3, nsp4, nps5 y nsp8 del HCoV-229E, y para las proteínas nsp3, nps12 y nsp14 de TGEV (apartado 8 de Materiales y Métodos). Desgraciadamente, ninguno de los anticuerpos testados reconoció bandas específicas en las células infectadas de tamaño compatible con las correspondientes nsps de PEDV (datos no mostrados).



**Figura 27. Acumulación de la proteína N en células infectadas con los mutantes rPEDV-NCPB.** Se infectaron células Vero a una moi de 1 con el virus parental rPEDV-CM1 (Nwt) y los virus mutantes rPEDV-N1 (N1), rPEDV-N2 (N2), rPEDV-N3 (N3) y rPEDV-N4 (N4). Se realizaron extractos proteicos a distintos tiempos después de la infección, y en la figura se muestran los datos a 10 hpi. Se detectó la proteína N y la β-actina, como control de carga, utilizando anticuerpos específicos.

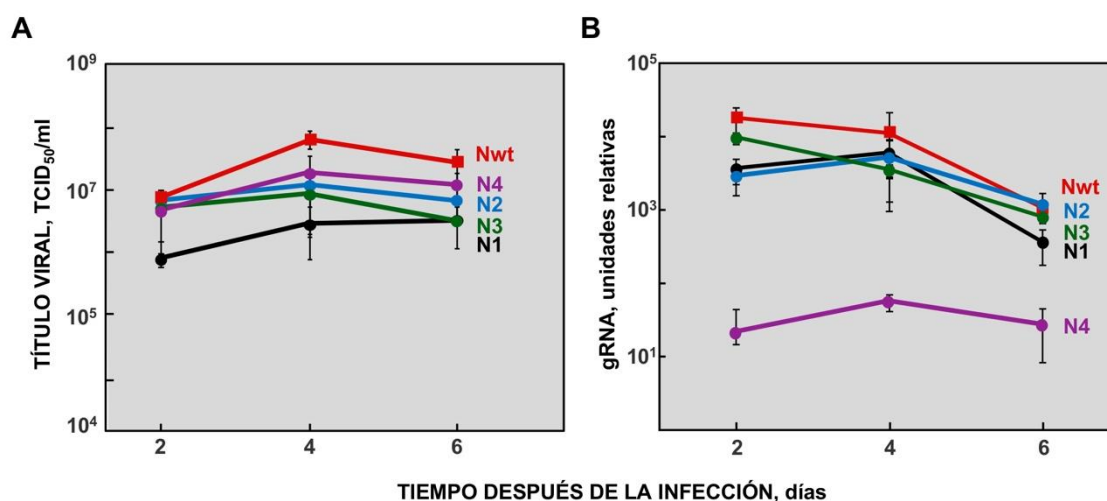
Por tanto, el posible efecto específico del cambio en el CPB del gen N tanto en la cinética de acumulación de la proteína N, como en la estabilidad del mRNA de la N, deberá ser analizado en el futuro utilizando técnicas alternativas y nuevos reactivos.

### 3.1.3. Virulencia de los virus mutantes rPEDV-NCPB

La patogenicidad de los mutantes rPEDV-NCPB se evaluó en lechones de cinco días de edad que se inocularon oralmente con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal. Todos los mutantes replicaban eficientemente en los tejidos diana (Fig. 28). Cabe destacar que el comportamiento de los virus mutantes in vivo fue diferente al observado



en cultivos celulares. En el caso de los mutantes rPEDV-N2 y rPEDV-N3, tanto los títulos (Fig. 28A) como la acumulación de gRNA viral (Fig. 28B) en intestino fueron ligeramente menores que los del virus parental, sin llegar a ser diferencias significativas. El virus rPEDV-N1 alcanzó un título 25 veces menor que el virus parental (Fig. 28A), siendo la acumulación de gRNA viral similar a la del virus parental (Fig. 28B). Por último, el virus rPEDV-N4, que mostró un crecimiento y síntesis de RNA viral inferiores al resto de mutantes en cultivos celulares, también mostró la menor acumulación de gRNA en el intestino de los animales infectados, con niveles de hasta 200 veces menos que el virus parental (Fig. 28B). En cambio, presentó títulos virales similares al virus parental (Fig. 28A).



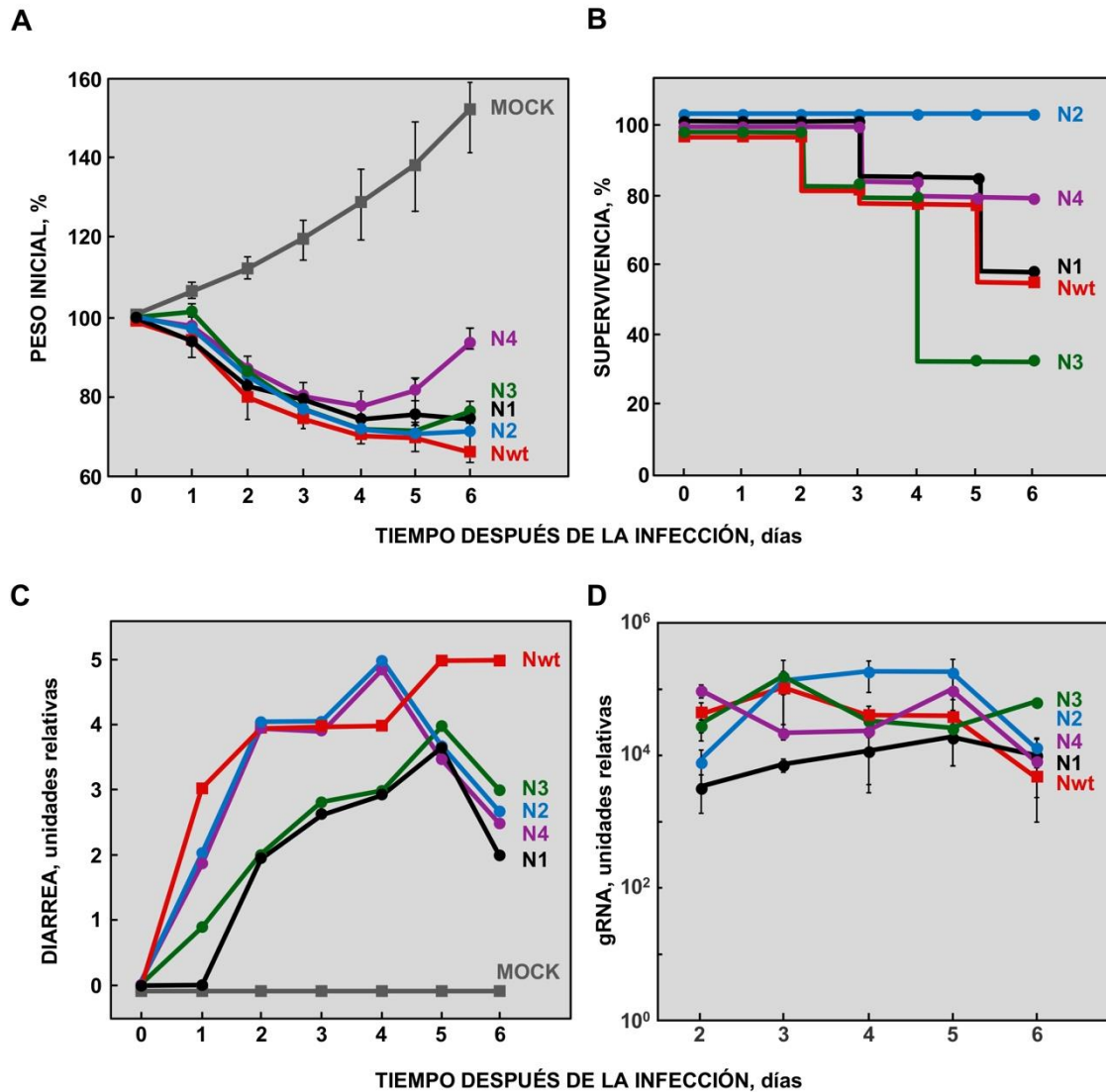
**Figura 28. Replicación de los virus mutantes rPEDV-NCPB in vivo.** Se inocularon oralmente lechones de 5 días de edad con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal del virus parental rPEDV-CM1 (Nwt, rojo) y los virus mutantes rPEDV-N1 (N1, negro), rPEDV-N2 (N2, azul), rPEDV-N3 (N3, verde) y rPEDV-N4 (N4, morado). Se analizaron el título viral (A) y la acumulación de RNA genómico (B) en el intestino de los animales a diferentes días después de la inoculación. Los datos representan la media de tres animales independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

Se secuenció el gen N a partir del RNA extraído del intestino de los animales a los días 4 y 6 después de la infección. Todas las mutaciones silenciosas introducidas en los mutantes se mantuvieron en el genoma de los virus aislados de intestino (datos no mostrados). En conjunto, los datos obtenidos indicaron que el efecto del cambio en el CPB del gen N de PEDV fue dependiente de tipo celular, y que, al igual que ocurría en cultivos celulares, afectaba la replicación de los mutantes en el intestino de los animales infectados.



## Resultados

Los animales no infectados ganaron peso y no mostraron ningún signo clínico (Fig. 29). Todos los animales infectados, tanto con el virus parental rPEDV-CM1 como con los mutantes rPEDV-NCPB, perdieron peso, aunque los inoculados con el virus rPEDV-N4 comenzaron a ganar peso a partir del día 4 después de la inoculación (Fig. 29A), lo que sugería que se recuperaron de la infección. Curiosamente, se obtuvo un rango de virulencia que fue desde una supervivencia del 30% para los animales infectados con el virus rPEDV-N3, al 100% de supervivencia para los infectados con el virus rPEDV-N2 (Fig. 29B). Los animales infectados con los virus rPEDV-N2 y rPEDV-N4 presentaron una diarrea severa que remitió a las 96 horas después de la inoculación, en comparación con los animales infectados con el virus parental (Fig. 29C). Esta remisión de signos clínicos estaba de acuerdo con la mayor supervivencia de los animales infectados con los virus rPEDV-N2 y rPEDV-N4, que fue del 100% y del 80% respectivamente (Fig. 29B). Por el contrario, los animales infectados con los mutantes rPEDV-N1 y rPEDV-N3 presentaron signos clínicos moderados (Fig. 29C) pese a causar la muerte del 40% y el 30% de los animales respectivamente (Fig. 29B). La diseminación viral en las heces de los animales infectados fue muy similar en todos los casos (Fig. 29D), excepto en el caso de los lechones infectados con el mutante rPEDV-N1, en los que el gRNA en heces fue 50 veces menor que en el resto (Fig. 29D). Este dato correlacionó con el menor título de el mutante rPEDV-N1 en el intestino (Fig. 28A).



**Figura 29. Virulencia de los virus mutantes rPEDV-NCPB.** Se inocularon lechones de 5 días de edad con  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/animal del virus parental rPEDV-CM1 (Nwt, rojo) y de los virus mutantes rPEDV-N1 (N1, negro), rPEDV-N2 (N2, azul), rPEDV-N3 (N3, verde), y rPEDV-N4 (N4, morado). Se analizaron la pérdida de peso (A), la supervivencia (B), los signos clínicos (C) y la diarrea (C). La carga viral en las heces se evaluó mediante RT-qPCR (D). Los datos representan la media de nueve animales independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

En base a estos resultados, se seleccionó el virus rPEDV-N2 como punto de partida para el posterior desarrollo de un candidato a vacuna, dado que este virus alcanzó títulos virales elevados en cultivos celulares e in vivo y estaba atenuado, causando una supervivencia del 100% en los animales infectados. El virus rPEDV-N2 produjo diarrea en los animales infectados, por tanto, era necesario introducir medidas de atenuación adicionales en el candidato a vacuna.

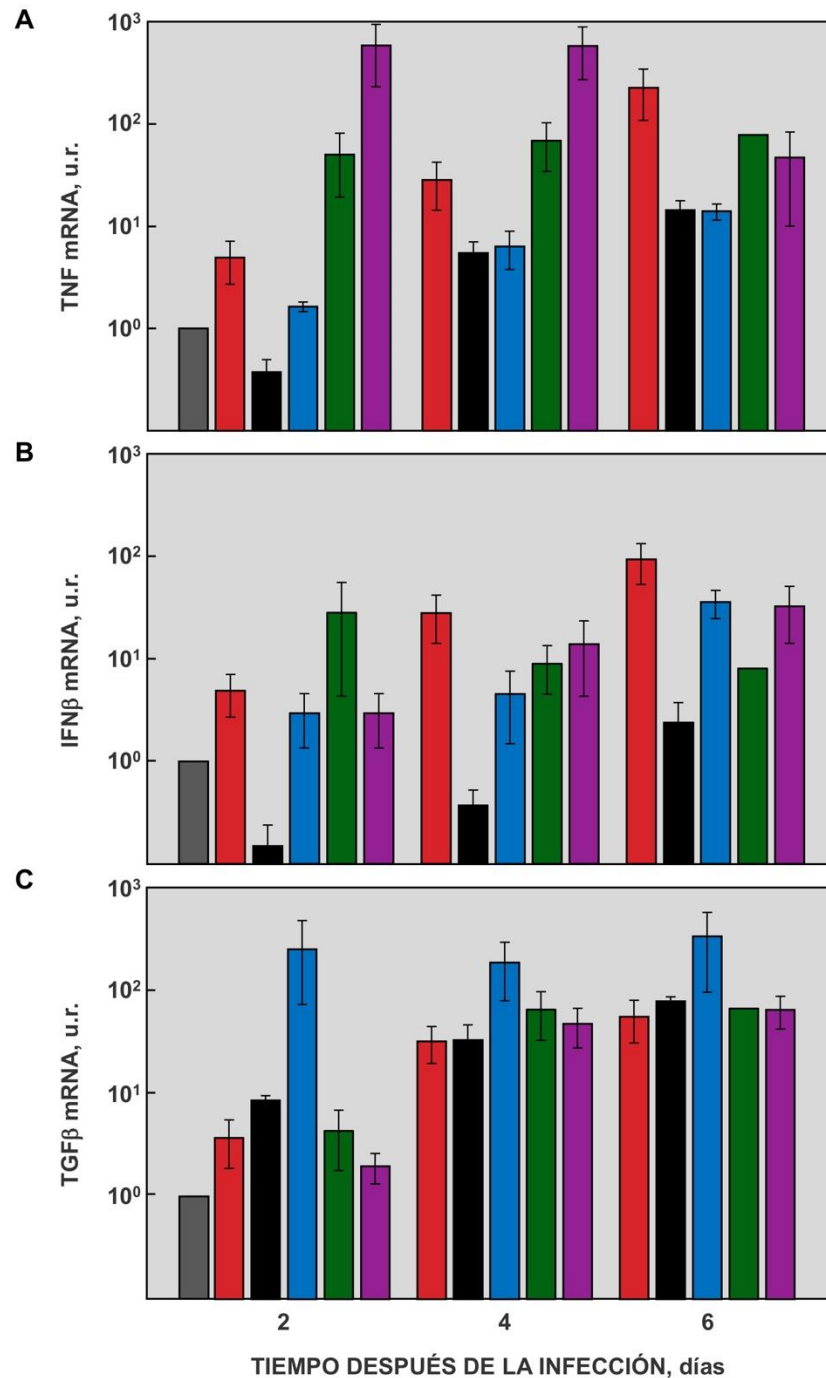
### 3.1.4. Respuesta inmune innata inducida por los mutantes N-CPB

La diferencia entre los resultados obtenidos en células Vero, deficientes en la producción de IFN, y en el ensayo in vivo, así como no correlación entre la virulencia y la replicación in vivo de los distintos mutantes NCPB, sugerían diferencias en la activación de la respuesta antiviral por cada virus mutante. Para analizar la respuesta inmune innata inducida por cada virus mutante rPEDV-NCPB, se evaluó, mediante RT-qPCR, la expresión de IFN $\beta$ , TNF y TGF $\beta$  en el intestino de los animales inoculados con los virus mutantes rPEDV-NCPB en comparación con los animales inoculados con el control parental rPEDV-CM1. La acumulación de estas tres citoquinas en el intestino de todos los animales infectados aumentó con el tiempo de infección y respecto a los niveles observados en animales sin infectar (Fig. 30). En el caso del TNF, se observó una menor acumulación en el caso de los animales infectados con los virus mutantes rPEDV-N1 y rPEDV-N2, comparados con los observados en los animales infectados con el virus parental (Fig. 30A). En contraste, los animales infectados con los virus rPEDV-N3 y rPEDV-N4 acumularon más mRNA de TNF que los infectados con el virus parental rPEDV-CM1 (Fig. 30A). Estos datos correlacionaron con los cambios en la frecuencia de CpG (Tabla 8 de esta sección), con una disminución en los mutantes rPEDV-N1 y rPEDV-N2 y un aumento en los mutantes rPEDV-N3 y rPEDV-N4. El aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias causado por un aumento en la frecuencia de CpG se ha descrito para otros virus RNA como IAV o el virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Gaunt, E., y col., 2016; Vabret, N., y col., 2017; Diaz-San Segundo, F., y col., 2016).

Excepto en el caso de los lechones infectados con el mutante rPEDV-N1, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA del IFN $\beta$  entre los animales infectados con los distintos mutantes y con el virus parental (Fig. 30B). En el caso del mutante rPEDV-N1, indujo niveles menores de IFN $\beta$ , comparado con el virus parental (Fig. 30B). Se ha descrito que mutantes de PEDV que inducen una activación de la producción de IFN, tanto de tipo I como de tipo III, están atenuados (Deng, X., y col., 2019; Hou, Y., y col., 2019). Por tanto, la menor

inducción de IFN $\beta$  por el virus mutante rPEDV-N1 podría contribuir a su virulencia, aún causando unos síntomas clínicos menores que el virus parental. En el caso del TGF $\beta$ , no se observaron diferencias significativas en la acumulación en intestino entre los virus mutantes y el virus parental, con la excepción de los animales infectado con el mutante rPEDV-N2 (Fig. 30C). En este caso, se produjo un incremento en la acumulación de TGF $\beta$ , especialmente a 2 dpi (Fig. 30C). Esta citoquina regula la producción, desarrollo y supervivencia de las células T (Li, C. K., y col., 2008). Entre ellas, de las células NK, cuyo aumento se ha relacionado con una menor virulencia de PEDV (Annamalai, T., y col., 2015). Además, el TGF $\beta$  tiene actividad antiinflamatoria (Yoshimura, A., y col., 2010) y un aumento en TGF $\beta$  se ha relacionado con una mayor supervivencia de los animales infectados por PEDV (Langel, S. N., y col., 2019). Por tanto, el aumento en los niveles de esta citoquina en los animales infectados con el virus mutante rPEDV-N2 correlacionaría con la mayor supervivencia observada.

En conjunto, este análisis preliminar de la respuesta inmune innata inducida por los virus mutantes rPEDV-NCPB sugirió que los cambios en la secuencia del gen de la N modulaban la virulencia de estos virus, en parte debido a cambios en la respuesta inmune innata.



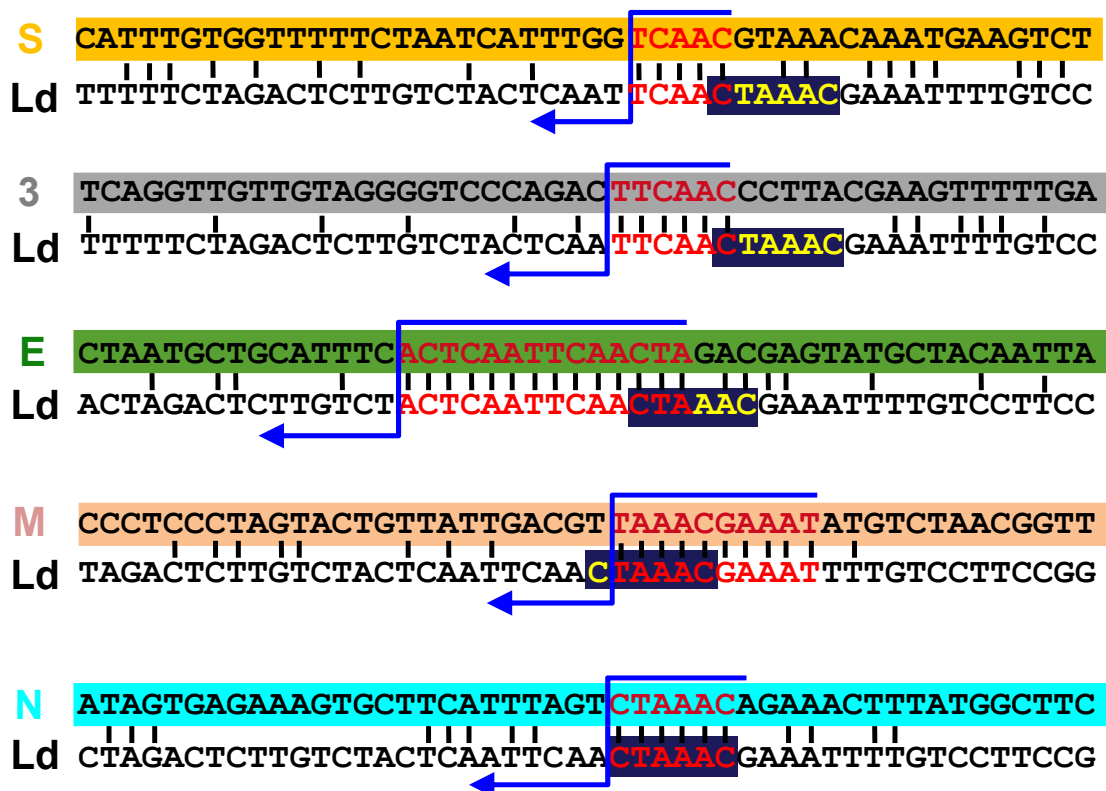
**Figura 30. Análisis de la expresión de citoquinas en los animales infectados por los mutantes rPEDV-NcpB.** Se extrajo el RNA total del intestino de lechones de cinco días no infectados (gris) o infectados oralmente con 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/animal del virus parental rPEDV-CM1 (rojo) y de los virus mutantes rPEDV-N1 (negro), rPEDV-N2 (azul), rPEDV-N3 (verde), y rPEDV-N4 (morado). Se analizó, mediante RT-qPCR, la acumulación de los mRNAs de TNF (A), IFNβ (B) y TGFβ (C) a los tiempos indicados después de la infección. En todos los casos, se utilizó el mRNA de GUSB como referencia, y los valores se representaron relativos a los obtenidos en los animales no infectados. Los datos representan la media de tres animales independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

### 3.2. Generación de virus rPEDV con duplicaciones de las TRSs

#### 3.2.1. Identificación de las TRSs en el genoma del rPEDV-CM1

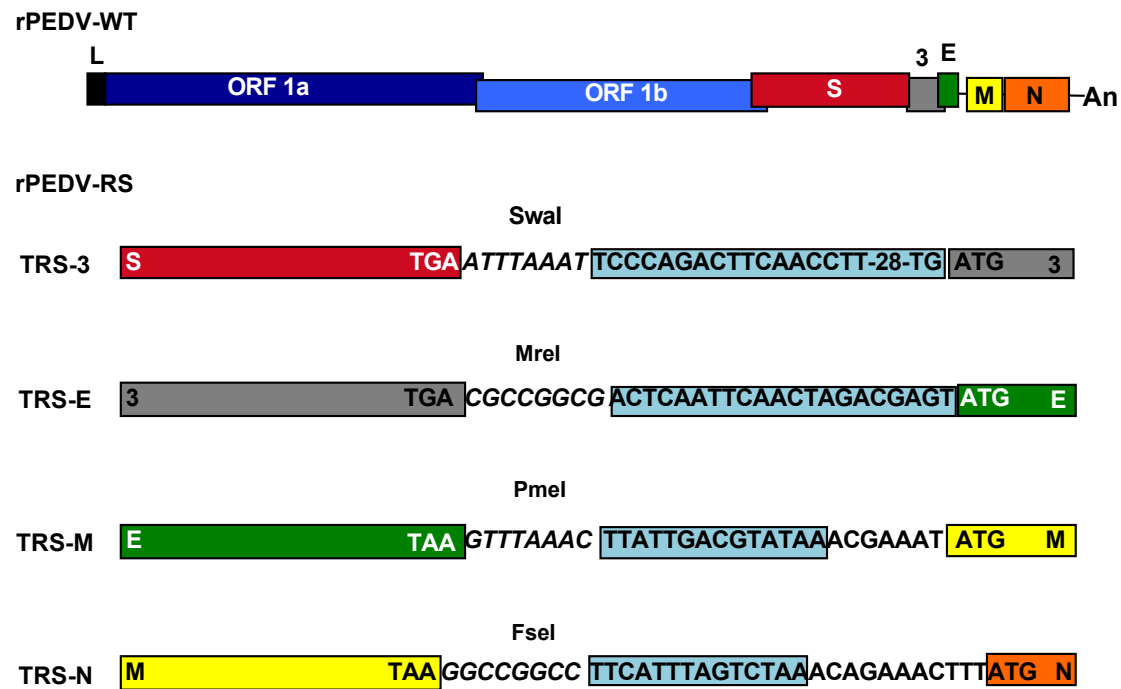
En el genoma de CoVs existe un solapamiento de los genes virales, tanto en las secuencias codificantes como en las secuencias que las flanquean y regulan su transcripción, denominadas TRSs (Sola, I., y col., 2015). Trabajos previos de nuestro grupo (Ortego, J., y col., 2003) y los resultados mostrados en el apartado 1 de esta sección de la tesis (Pascual-Iglesias, A., y col., 2019) han demostrado que la duplicación de las TRSs, con el fin de evitar este solapamiento entre genes, y la introducción de sitios únicos de restricción, resulta en la atenuación viral.

Las TRSs de la cepa de PEDV CV777 se determinaron experimentalmente incluso antes de conocerse la secuencia completa del virus (Tobler, K. y Ackermann, M., 1998). Al contrario de lo que sucede en otros coronavirus (Sola, I., y col., 2015), solo se identificó un hexanucleótido central conservado (5'-CUAAAC-3') en el extremo 3' del líder y precediendo al gen N. Este hecho, junto con que la cepa CV777 pertenece al genogrupo G1, mientras que la cepa USA/Iowa/18984/2013 (en la que se basó el virus rPEDV-CM1) pertenece al genogrupo G2, indicó la necesidad de determinar experimentalmente las TRSs del rPEDV-CM1. Para ello, se amplificaron específicamente los sgRNAs que codifican las proteínas S, 3, E, M y N y se secuenciaron los productos amplificados. El análisis de los sitios de fusión entre el líder y el gen identificó unas TRSs muy conservadas respecto a las descritas para la cepa CV777 (Utiger, A., y col., 1995) (Fig. 31), con variaciones en las 3'-TRSs de los genes M y N. Un análisis reciente de las TRSs de la cepa PEDV TW, también del genogrupo G2, ha identificado TRSs muy similares a las determinadas en esta tesis doctoral (Tsai, T. L., y col., 2018b). Como era de esperar, se ha descrito que los cambios en las 3'TRSs respecto a la cepa CV777, alteran los niveles de transcripción de los sgRNAs afectados (Tsai, T. L., y col., 2018a).



**Figura 31. Identificación de las TRSs del virus rPEDV-CM1.** Se analizaron las secuencias en las zonas de unión entre el líder y el cuerpo de los mRNAs virales. Las secuencias en las cajas de colores corresponden a la secuencia del genoma viral en la zona de la fusión. La secuencia inferior representa la secuencia del líder (Ld). La CS del líder aparece en una caja azul oscura. Las barras verticales indican identidad de secuencia, con letras rojas en el posible sitio de fusión. El entrecruzamiento de secuencias puede ocurrir en cualquier nucleótido debajo de las flechas.

Una vez identificadas las TRSs, se diseñaron varios cDNAs infectivos basados en el pBAC-PEDV-N2 (apartado 3.1 de esta sección) a los que se añadieron dos (TRS-3 y TRS-E), tres (TRS-3, TRS-E y TRS-M) y cuatro (TRS-3, TRS-E, TRS-M, y TRS-N) duplicaciones de las TRS (Fig. 32), generándose los clones infectivos pBAC-PEDV-2RS-N2, pBAC-PEDV-3RS-N2 y pBAC-PEDV-4RS-N2, respectivamente. Además, se introdujeron sitios únicos de restricción precediendo cada duplicación de las TRSs de los genes 3, E, M y N del rPEDV-N2 (Fig. 32).

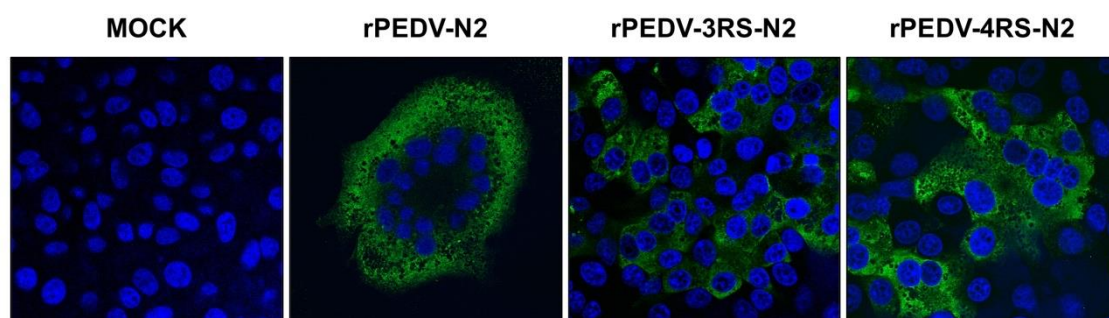


**Figura 32. Diseño de las duplicaciones de las TRS e introducción de sitios de restricción.**

El esquema superior representa el virus parental rPEDV-CM1. Los nombres en las cajas indican los genes virales. L, secuencia líder; An, poli-A. En los esquemas inferiores se representan las modificaciones en las TRSs de los genes 3 (TRS-3), E (TRS-E), M (TRS-M) y N (TRS-N). Las secuencias duplicadas están indicadas en cajas de color azul claro y las dianas de restricción introducidas se indican en cursiva. Cada gen se representa en las cajas con los mismos colores que en el esquema del virus, indicando el codón de parada y de inicio.

### 3.2.2. Rescate y caracterización de los virus rPEDV-RS-N2

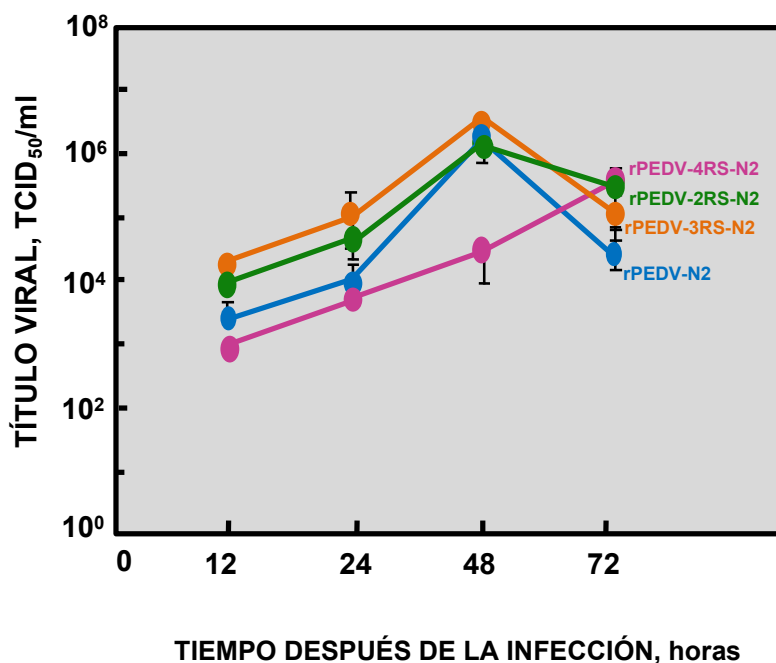
Los virus rPEDV-2RS-N2, rPEDV-3RS-N2 y rPEDV-4RS-N2 se rescataron después de la transfección de las células Vero con los cDNAs correspondientes. En todos los casos se observó un efecto citopático que consistía en la formación de sincitios, aunque este efecto estaba significativamente retrasado en el caso de las infecciones con los virus rPEDV-3RS-N2 y rPEDV-4RS-N2 (Fig. 33).





**Figura 33. Efecto citopático en células infectadas con los virus mutantes rPEDV-3RS-N2 y rPEDV-4RS-N2.** Se infectaron células Vero a una moi de 0.1 con el virus parental rPEDV-N2 y los virus mutantes rPEDV-3RS-N2 y rPEDV-4RSN2. Las células no infectadas (Mock) o infectadas se fijaron a 48 hpi, y la proteína N se marcó con un anticuerpo específico (verde).

En cinéticas de crecimiento en cultivos celulares preliminares, el mutante rPEDV-4RS-N2 presentó un retraso de 24 h en alcanzar los títulos máximos, con respecto al virus parental rPEDV-N2 (Fig. 34). Este resultado estaba de acuerdo con el retraso observado en el efecto citopático. Sin embargo, los mutantes rPEDV-2RS-N2 y rPEDV-3RS-N2 presentaron cinéticas de crecimiento similares a las del virus parental (Fig. 34).



**Figura 34. Cinética de crecimiento de los virus rPEDV-N2, rPEDV-2RS-N2, rPEDV-3RS-N2 y rPEDV-4RS-N2.** Se infectaron células Vero a una moi de 0.01 con los virus rPEDV-N2 (azul) como control, rPEDV-2RS-N2 (verde), rPEDV-3RS-N2 (naranja) y rPEDV-4RS-N2 (magenta). Se analizó el título viral a distintos tiempos después de la infección. Los datos representan la media de dos infecciones independientes. Las barras de error indican la desviación estándar en cada caso.

En un futuro próximo se completará el estudio en cultivos celulares y se evaluará la virulencia de los virus mutantes rPEDV-2RS-N2, rPEDV-3RS-N2 y rPEDV-4RS-N2, así como su estabilidad genética, con el fin de determinar si la

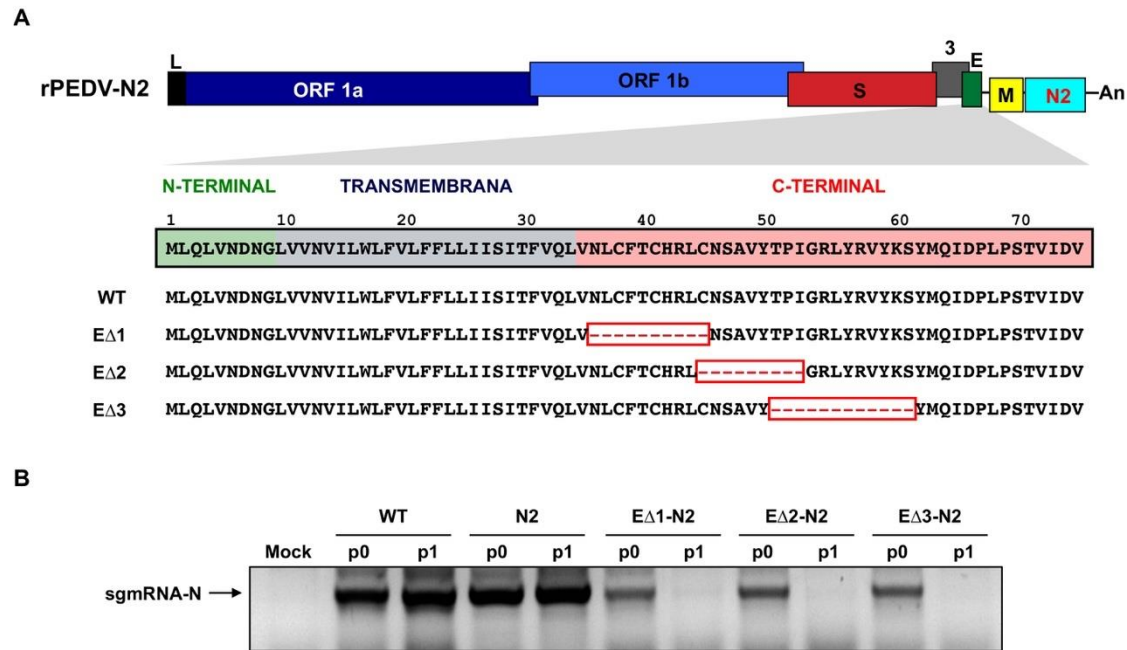
modificación del CPB del gen N junto con la duplicación de las TRSs es suficiente para generar un candidato a vacuna más seguro.

### **3.3. Generación de virus rPEDV con eliminación de secuencias cortas en el gen de la proteína E**

Como se ha expuesto anteriormente, la proteína E es un factor de virulencia cuyo requerimiento es variable en distintos CoVs (DeDiego, M. L., y col., 2014). Previamente, en nuestro laboratorio se han obtenido candidatos a vacuna para SARS-CoV (Regla-Nava, J. A., y col., 2015) y MERS-CoV (J. Gutierrez-Alvarez, I. Sola y L. Enjuanes, manuscrito en preparación) basados en pequeñas deleciones en la proteína E. Es más, la combinación de este tipo de mutaciones, junto con pequeñas deleciones en la proteína nsp1 permitió la obtención de un candidato a vacuna para SARS-CoV genéticamente estable tanto en cultivos celulares como in vivo (Jimenez-Guardeno, J. M., y col., 2015).

Con el fin de desarrollar un candidato a vacuna mejorado, basado en el virus rPEDV-N2 (apartado 3.1 de esta sección), en paralelo con la estrategia de duplicación de las TRSs, se diseñaron virus mutantes con eliminaciones pequeñas de secuencia en el carboxilo terminal de la proteína E (Fig. 35A). Se generaron tres mutantes parcialmente solapantes ( $\Delta E1$ ,  $\Delta E2$  y  $\Delta E3$ ) atendiendo a la conservación de residuos en las proteínas E de distintos CoVs, así como a la información previa obtenida por nuestro grupo (Regla-Nava, J. A., y col., 2015). Estas mutaciones se introdujeron en el cDNA infeccioso pBAC-PEDV-N2, obteniéndose los clones infecciosos pBAC-PEDV- $\Delta E1$ -N2, pBAC-PEDV- $\Delta E2$ -N2 y pBAC-PEDV- $\Delta E3$ -N2.

En ninguno de los casos se obtuvo virus infeccioso a partir de la transfección de los cDNAs correspondientes. Sin embargo, se comprobó que los virus eran eficientes en replicación y transcripción (Fig. 35B).



**Figura 35. Diseño de virus rPEDV-N2 con eliminación de secuencias en la proteína E.** (A) Esquema de los mutantes de PEDV en la proteína E. En la parte superior se representa el genoma del virus rPEDV-N2. La región expandida muestra la secuencia de la proteína E y sus diferentes dominios. Los aminoácidos eliminados en cada mutante se indican con los cuadros rojos. (B) Se extrajo el RNA total de las células Vero del p0 y p1 después de la transfección de los cDNAs infectivos. Se analizó la presencia del sgmRNA-N como indicador de la síntesis de RNA viral. Se indica el resultado para las células no infectadas (Mock), así como para las células infectadas con los virus parentales rPEDV-CM1 (WT) y rPEDV-N2 (N2), y los virus mutantes rPEDV-ΔE1-N2 (ΔE1-N2), rPEDV-ΔE2-N2 (ΔE2-N2) y rPEDV-ΔE3-N2 (ΔE3-N2).

Estos datos indicaron que los virus rPEDV que contenían las delecciones en la proteína E eran eficientes en replicación y defectivos en propagación. Estos virus podrían ser la base de un candidato a vacuna administrado como replicón y, por tanto, más bioseguro que una vacuna viva atenuada convencional.

## ***DISCUSIÓN***

Las vacunas vivas atenuadas son una de las mejores opciones para proteger frente a la infección por PEDV, dado que las vacunas basadas en antígenos no replicativos, como por ejemplo las vacunas inactivadas, protegen sólo parcialmente, en parte porque inducen una inmunidad en mucosas ineficiente (Crawford, K., y col., 2016; Langel, S. N., y col., 2016). Sin embargo, las vacunas vivas atenuadas tradicionales, obtenidas por pases seriados en cultivos celulares, no son eficaces para controlar la infección, como se ha observado al administrarlas extensivamente en países en los que han surgido las nuevas cepas virulentas de PEDV (Song, D., y col., 2015a; Sun, D., y col., 2016). Por ello, es necesario desarrollar nuevas vacunas vivas atenuadas, que sean eficaces y seguras, para proteger frente a las nuevas cepas virulentas de PEDV.

Durante la realización de esta tesis doctoral se han generado, mediante genética reversa, virus atenuados como candidatos a vacuna. Primero, estos se basaron en un virus quimérico TGEV-PEDV que, evaluado en el hospedador natural, lechones jóvenes, indujo una respuesta humoral neutralizante específica para el PEDV, que indujo una elevada protección frente al desafío con un PEDV virulento. Por otro lado, se ha generado un cDNA infectivo para una cepa virulenta de PEDV. Tomando como base este virus, se han diseñado distintas estrategias de atenuación del PEDV para la obtención de una vacuna viva atenuada.

## **1. EL VIRUS rTGEV-RS-SPEDV COMO CANDIDATO A VACUNA**

Este virus quimérico, formado por el virus TGEV en el que se ha sustituido el dominio extraviral por el de la proteína S de una cepa virulenta del PEDV, contenía mutaciones atenuantes localizadas en distintas regiones del genoma viral. Por el contrario, las vacunas vivas atenuadas tradicionales contienen mutaciones no controladas en todo el genoma viral, introducidas durante los pases en cultivos celulares. Este tipo de vacunas, después de varios pases in vivo, frecuentemente han llevado a la reversión al fenotipo virulento (Li, R., y col., 2016). De hecho, varias de las cepas epidémicas que circulan actualmente en Asia provienen de las vacunas vivas atenuadas que se llevan utilizando desde hace años.

El candidato a vacuna rTGEV-RS-SPEDV tiene la ventaja de replicar en el yeyuno de los animales infectados tan eficientemente como el virus control

virulento, pero sin causar una patología significativa y probablemente induciendo una respuesta protectora mediada por IgAs. De hecho, los animales vacunados con este virus se protegieron frente al desafío con un PEDV virulento. En cambio, las vacunas atenuadas tradicionales presentan una gran reducción en su replicación en el tracto entérico, debido a su adaptación a cultivos celulares (Lin, C. M., y col., 2017). Como consecuencia, estas vacunas no replican a un nivel lo suficientemente alto para inducir la producción de IgAs y una buena respuesta inmune lactogénica (Chattha, K. S., y col., 2015; Langel, S. N., y col., 2016; Lin, C. M., y col., 2019).

El virus parental rTGEV-SPEDV, generado en esta tesis, se asimila al SeCoV y, como demuestran nuestros datos, es virulento en lechones de cinco días de edad. Sin embargo, el virus mutante rTGEV-RS-SPEDV, utilizado como candidato a vacuna, estaba atenuado. Existen varias diferencias genéticas que permitirían discriminar entre animales infectados con SeCoV y vacunados con el rTGEV-RS-SPEDV, tales como: (1) el virus rTGEV-RS-SPEDV no contiene el gen S de PEDV completo, (2) expresa la proteína 3a de TGEV, y (3) debido a la cepa de TGEV utilizada para generar el cDNA infectivo, no expresa la proteína 3b de TGEV (Zuniga, S., y col., 2004).

El candidato a vacuna rTGEV-RS-SPEDV fue genéticamente estable en cultivos celulares; sin embargo, in vivo el virus cambió su secuencia. Por tanto, por bioseguridad se debe seleccionar por pases in vivo y por genética reversa variantes del mismo que sean atenuados y estables. El candidato a vacuna optimizado deberá mantener un balance entre la disminución de la replicación y la inducción de una respuesta inmune eficiente.

La estrategia aplicada a la obtención de una vacuna basada en la generación del virus recombinante rTGEV-RS-SPEDV se poa otros CoVs, incluso alejados filogenéticamente, como ha demostrado previamente nuestro grupo (Ribes, J. M., y col., 2011). Por tanto, supone una aproximación versátil y rápida para el desarrollo de vacunas vivas atenuadas, especialmente aplicable a los nuevos CoVs entéricos porcinos emergentes.

## **2. INGENIERÍA GENÉTICA Y VACUNAS PARA PEDV**

El uso de sistemas de genética reversa permite modificaciones selectivas y controladas en el genoma de los virus, lo que supone un gran progreso para la

obtención de vacunas vivas atenuadas eficaces y seguras (Enjuanes, L., y col., 2016;Zuñiga, S., y col., 2016). Además, este tipo de estrategias permiten acortar el tiempo necesario entre el desarrollo de una vacuna y la aprobación de su uso (Papaneri, A. B., y col., 2015;Rappuoli, R., 2014).

Durante mucho tiempo, la generación de clones infectivos de CoVs estuvo limitada por el gran tamaño de su genoma y la existencia de regiones tóxicas en los genes de la replicasa, que impedían su clonaje y crecimiento en bacterias. El primer cDNA infectivo derivado de CoVs se construyó en nuestro laboratorio para el TGEV y se ensambló en un BAC (Almazan, F., y col., 2000). Posteriormente, esta estrategia también se ha empleado para desarrollar clones infectivos para el SARS-CoV, el HCoV-OC43, el coronavirus felino (FIPV) y el MERS-CoV (Almazan, F., y col., 2006;Almazan, F., y col., 2014;Balint, A., y col., 2012;St-Jean, J. R., y col., 2006). Existen otras estrategias para la generación de clones infectivos de CoVs, que se han utilizado para la construcción de clones infectivos de los virus TGEV, HCoV-229E, MHV, IBV, SARS-CoV, HCoV-NL63, FIPV y MERS-CoV (Almazan, F., y col., 2014;Casais, R., y col., 2001;Coley, S. E., y col., 2005;Donaldson, E. F., y col., 2008;Scobey, T., y col., 2013;Tekes, G., y col., 2012;Thiel, V., y col., 2001;van den Worm, S. H., y col., 2012;Youn, S., y col., 2005;Yount, B., y col., 2002;Yount, B., y col., 2005).

Una de las dificultades para generar un clon infectivo de PEDV, fue la selección del genoma viral, dado que la mayor parte de secuencias virales en GenBank proceden de muestras biológicas, y se ha estimado que sólo entre un 2 y 10% de virus PEDV procedentes de muestras de campo son aislados en cultivos celulares (Oka, T., y col., 2014). Para la realización de esta tesis, se eligió la cepa virulenta PEDV USA/IOWA/18984/2013, que se aisló a partir de muestras biológicas y mantenía la virulencia después de seis pases en cultivos celulares (Hoang, H., y col., 2013;Madson, D. M., y col., 2014;Madson, D. M., y col., 2016). Nuestros resultados confirman estas observaciones y además probaron que un cDNA infectivo con la secuencia de este aislado viral daba lugar a un virus recombinante virulento.

Durante el desarrollo de esta tesis, otros grupos han descrito cDNAs infectivos de PEDV. Tres de ellos, siguiendo la tecnología previamente descrita por nuestro laboratorio, utilizan BACs. Estos grupos obtuvieron el cDNA de una cepa de Tailandia adaptada a cultivos (AVCT12) (Jengarn, J., y col., 2015), y otros dos

cepas chinas: la cepa atenuada CHM2013 y la cepa virulenta BJ2011C (Li, J., y col., 2017). Hasta la fecha, estos cDNAs infectivos únicamente se han utilizado como herramientas para estudiar aspectos básicos de la infección viral en cultivos celulares, y ninguno de ellos se ha utilizado para el desarrollo de candidatos a vacuna. Los otros tres cDNAs infectivos se han generado mediante ligación in vitro, para la cepa china virulenta AH2012/12 (Fan, B., y col., 2017), una cepa virulenta de EE.UU (PC22A) (Beall, A., y col., 2016) y una cepa atenuada aislada en Taiwan PEDVPT-P96 (Kao, C. F., y col., 2018). En el caso de la cepa de Taiwan, el virus recombinante obtenido se ha propuesto como candidato a vacuna, dado que protege frente a un desafío homólogo (Kao, C. F., y col., 2018). Sin embargo, al estar basado en la cepa PEDVPT-P96, atenuada mediante pases seriados en cultivos celulares, presenta los mismos problemas de posible reversión al fenotipo virulento que las vacunas vivas atenuadas tradicionales.

Recientemente, utilizando el cDNA infectivo del PEDV PC22A, se ha generado el primer candidato a vacuna en el que el virus se ha atenuado introduciendo cambios específicos en el genoma viral (Hou, Y., y col., 2019). Este candidato a vacuna (PC22A-KDKE<sup>4A</sup>-SYA) contiene cinco mutaciones puntuales: una que elimina la señal de endocitosis en la proteína S, que atenúa parcialmente al virus (Hou, Y., y col., 2019), y cuatro mutaciones puntuales en la nsp16, que suprimen la actividad 2-O-MTasa. Este tipo de mutaciones en la nsp16 se han utilizado previamente para atenuar otros CoVs como el SARS-CoV (Menachery, V. D., y col., 2014) o MERS-CoV (Menachery, V. D., y col., 2017). El mecanismo que media la atenuación de estos mutantes es la mayor inducción de IFN durante la infección por el virus mutante sin actividad 2-O-MTasa (Zust, R., y col., 2011). De hecho, el virus PC22A-KDKE<sup>4A</sup>-SYA induce una mayor respuesta de IFN tipo I y tipo III en células porcinas (Hou, Y., y col., 2019). Aunque el candidato a vacuna es estable durante tres pases in vivo (Hou, Y., y col., 2019), su seguridad podría no ser suficiente, al contener únicamente cinco mutaciones puntuales en dos posiciones del genoma. El aspecto de la seguridad es especialmente relevante, dado que el virus PC22A-KDKE<sup>4A</sup>-SYA produce diarrea en lechones gnotobióticos de cuatro días de edad, y el virus se disemina vía fecal.



En contraste, las estrategias de atenuación propuestas en esta tesis incluyen la introducción de múltiples cambios en al menos, dos localizaciones del genoma. En uno de los casos, la generación del mutante rPEDV-N2, implicó la introducción de 191 mutaciones silenciosas y, además, la duplicación de al menos dos TRSs, o la eliminación de pequeñas secuencias en el gen de la proteína E. Estas estrategias, muy probablemente, suponen un aumento en la seguridad de nuestro candidato a vacuna, dado que la reversión al fenotipo virulento sería mas complicada que en el caso del candidato a vacuna PC22A-KDKE<sup>4A</sup>-SYA recientemente descrito.

### **3. CONSTRUCCIÓN DE UNA VACUNA PARA EL PEDV MEDIANTE EL CAMBIO EN EL CPB Y MODULACIÓN DE LA VIRULENCIA**

El trabajo realizado en esta tesis con el cDNA infectivo de PEDV se basa en parte en la biología sintética utilizada previamente (Wimmer, E.y Paul, A. V., 2011;Martinez, M. A., y col., 2016). De hecho, implica la obtención de un virus recombinante rPEDV diseñado a partir de una secuencia obtenida de GenBank, sintetizadas químicamente, y el diseño y obtención de virus PEDV mutantes con secuencias que no existen en la naturaleza, como en el caso de los mutantes con cambios en el CPB del gen N. Los cuatro virus rPEDV-NCPB diseñados fueron todos viables y no se mantuvieron viables con los pases, algo que no siempre ocurre al hacer cambios en el CPB de uno o varios genes, tal como se ha observado para los virus VSV (Wang, B., y col., 2015), Dengue (Staauft, C. B., y col., 2018) o Zika (Li, P., y col., 2018). Posiblemente, el éxito en el rescate de los virus se debió, en parte, a la selección del gen de la proteína N para el cambio del CPB. Esta proteína posee funciones muy relevantes tanto para el virus como en la interacción con el hospedador (Almazan, F., y col., 2004;Liwnaree, B., y col., 2019;McBride, R., y col., 2014;Schelle, B., y col., 2005;Surjit, M.y Lal, S. K., 2008;Zhang, Q.y Yoo, D., 2016;Zuñiga, S., y col., 2016), pero no una actividad enzimática crítica para las primeras etapas del ciclo viral, como por ejemplo la actividad RdRp, o las proteasas virales. Por otro lado, se evitaron cambios extremos en el CPB, que en general no eran tolerados en otros sistemas virales (Wang, B., y col., 2015;Staauft, C. B., y col., 2018).

El cambio en el CPB se ha propuesto como una estrategia segura para el diseño de vacunas vivas atenuadas, por la dificultad en la reversión al fenotipo

virulento, dado el elevado número de mutaciones silenciosas que se introducen en el genoma viral (Wimmer, E. y Paul, A. V., 2011; Martínez, M. A., y col., 2016). De hecho, en nuestro caso, la generación de los virus mutantes supuso la introducción de entre 118 y 280 mutaciones en el genoma de cada uno de los virus. En los virus generados se comprobó la ausencia de alteraciones en las secuencias diseñadas en los virus recuperados tanto del intestino de los lechones infectados con estos virus, aislados de las heces de los lechones infectados. Es interesante destacar que, hasta la fecha, sólo en el caso de mutantes de poliovirus generados utilizando la misma aproximación experimental, también se ha comprobado la estabilidad genética después de 19 pases en cultivos celulares (Coleman, J. R., y col., 2008b). Así mismo, en los pases in vivo sólo en el caso de un mutante de PRRSV con cambios en el CPB de la glicoproteína 5 también se mantuvo la secuencia de virus creado por genética reversa (Ni, Y. Y., y col., 2014).

En nuestro laboratorio, el diseño de los mutantes rPEDV-NCPB dio lugar a virus con un rango amplio de virulencia. Cabe destacar que, en la mayoría de los virus en los que se ha aplicado esta estrategia, se han generado mutantes que modifican el CPB de uno o varios genes diana. En ese sentido, el mutante rPEDV-N4 generado en esta tesis se comportó como mutantes similares descritos para otros virus: disminuyó su replicación, la síntesis de RNA viral, la acumulación de la proteína N y estaba atenuado, probablemente por aumento en la frecuencia de xxCpGxx, dado que induce la respuesta inmune del hospedador, aunque causaba cierta enteritis (Coleman, J. R., y col., 2008b; Mueller, S., y col., 2010b; Ni, Y. Y., y col., 2014; Wang, B., y col., 2015; Le Nouen, C., y col., 2014; Shen, S. H., y col., 2015; Stauff, C. B., y col., 2018; Stauff, C. B., y col., 2019; Li, P., y col., 2018).

Únicamente en el caso de poliovirus y del VSV se han descrito mutantes que aumentan el CPB del gen diana, que mantienen la virulencia o atenúan el virus, respectivamente (Coleman, J. R., y col., 2008b; Wang, B., y col., 2015). El mutante rPEDV-N1 generado en esta tesis mantuvo la virulencia del virus parental, a pesar de que disminuyeron significativamente tanto el título viral en el intestino como la diseminación del virus en heces, y se redujeron los signos clínicos. Cabe destacar que el mutante rPEDV-N1 redujo la respuesta inmune innata en el intestino, con una disminución de los mRNAs de TNF e IFN $\beta$ ,

probablemente debido en parte a la disminución en la frecuencia de xxCpGxx. Este virus se comportó como el mutante previamente descrito de VSV, en el que disminuyen tanto los títulos como la respuesta pro-inflamatoria in vivo, lo que en ese caso conduce a la atenuación viral (Wang, B., y col., 2015). Será interesante investigar en el futuro el mecanismo por el que la disminución observada en la respuesta inmune innata favoreció la virulencia de PEDV. En el caso del mutante rPEDV-N2, se comportó como el mutante descrito previamente para poliovirus (Coleman, J. R., y col., 2008b), en el que no cambiaron los títulos virales in vivo ni los signos clínicos respecto al virus parental, y sin embargo se comportó como el mutante descrito para VSV (Wang, B., y col., 2015), en el que disminuyeron ligeramente la acumulación de TNF en IFN $\beta$  y estaba atenuado dado que el 100% de los animales infectados sobrevivieron a la infección. La disminución en la frecuencia de xxCpGxx podría explicar la reducción en la acumulación de citoquinas pro-inflamatorias, pero no el fenotipo atenuado, dado al que en el caso del rPEDV-N1 la disminución en la respuesta inmune innata dio lugar a un virus virulento. Por tanto, a la atenuación del rPEDV-N2 probablemente también contribuyó el aumento en la citoquina anti-inflamatoria TGF $\beta$  relacionada con una mayor supervivencia de los animales infectados por PEDV (Langel, S. N., y col., 2019). Los candidatos a vacuna diseñados durante esta tesis se basaron en este virus rPEDV-N2. Cabe destacar que el mutante VSV, atenuado por aumento en el CPB, protege frente a un desafío virulento (Wang, B., y col., 2015).

Mención especial merece el fenotipo inesperado del virus rPEDV-N3, en el que se disminuyó el CPB dando lugar a un virus más virulento que el parental. El comportamiento que hemos descrito para los mutantes en el CPB es la primera vez que se muestra como una disminución en el CPB da lugar a un virus virulento, lo que refuerza la imprevisibilidad del resultado del cambio en el CPB y la necesidad de explorar la posible ganancia de función, especialmente cuando la estrategia del cambio en el CPB se aplica a virus transmitidos por vectores, ya que estos cambios son mucho más drásticos en ese caso (Shen, S. H., y col., 2015; Stauff, C. B., y col., 2018). El aumento de virulencia en el rPEDV-N3 se podría deber, al menos en parte, al aumento en la respuesta inmune innata, en ausencia de defectos en la replicación viral (a diferencia de lo que ocurrió con el virus rPEDV-N4). Sin embargo, ninguno de los parámetros analizado durante

esta tesis explicó completamente el fenotipo virulento del rPEDV-N3 y, por tanto, se requieren análisis adicionales.

Entre otros análisis, se ampliará el estudio de la respuesta inflamatoria inducida por los mutantes rPEDV-NCPB, analizando la producción de IFN- $\lambda$  y respuesta de células Th17 en el intestino de los animales infectados, dado que las células Th17 son muy relevantes en la protección frente a respuestas pro-inflamatorias en mucosas, especialmente en intestino y pulmón (Stockinger, B.y Omenetti, S., 2017). Estas células se caracterizan por la producción de IL-17, IL-22 e IL-23, y pueden cooperar con otras citoquinas para la eliminación de patógenos entéricos (Stockinger, B.y Omenetti, S., 2017). De hecho, se ha demostrado que es necesaria una sinergia entre IFN- $\lambda$  e IL-22 para controlar las infecciones por rotavirus (Hernandez, P. P., y col., 2015). Además, las células Th17 en intestino promueven respuestas mediadas por IgAs y se mantienen como una población de células memoria en mucosas, necesaria en re-infecciones (Christensen, D., y col., 2017). Por último, se ha demostrado que es necesario un balance entre células Th17 y células T reguladoras (Treg) para evitar respuestas inmunopatológicas perjudiciales después de la infección (Sehrawat, S.y Rouse, B. T., 2017). Este balance está modulado por citoquinas como IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-22, TGF $\beta$ , IL-2 o IL-6 (Sehrawat, S.y Rouse, B. T., 2017).

Actualmente se desconocen, en gran medida, los mecanismos moleculares que aumentan la virulencia de las actuales cepas epidémicas de PEDV, en comparación con las cepas clásicas. Se ha propuesto que la respuesta inmune innata del hospedador podría ser la causa, dado que en cultivos celulares las cepas virulentas inducen una mayor activación de NF- $\kappa$ B y expresión de citoquinas pro-inflamatorias que las cepas atenuadas (Guo, X., y col., 2016). Sin embargo, no existen estudios in vivo en este sentido. La proteína N también se ha relacionado con la virulencia del PEDV, dado que induce la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Xu, X., y col., 2013b), probablemente por la activación de las rutas iniciadas por receptores de tipo Toll (TLRs) (Cao, L., y col., 2015b). Por otro lado, la sobre-expresión de la proteína N reduce la producción de IFN (Cao, L., y col., 2015a; Ding, Z., y col., 2014), a pesar de que la secuencia de la proteína N no cambia en los mutantes rPEDV-NCPB generados durante esta tesis. De lo descrito se concluye que estos virus

son una herramienta valiosa que permitirá estudiar las bases moleculares de la patogénesis de PEDV.

#### 4. ESTRATEGIAS ADICIONALES PARA LA ATENUACIÓN DE PEDV

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se diseñaron varios virus con duplicaciones en las TRSs, con el objetivo de que estuviesen atenuados. El virus quimérico rTGEV-RS-SPEDV, se construyó utilizando un recombinante atenuado del virus TGEV (Ortego, J., y col., 2003). Además, esta atenuación se combinó con distintas mutaciones en la proteína N. Una de estas combinaciones dio lugar al virus rPEDV-RS-N2. El crecimiento de los virus rTGEV-RS o rTGEV-RS-SPEDV en cultivos celulares no disminuyó significativamente comparado con el del virus parental (Ortego, J., y col., 2003; Pascual-Iglesias, A., y col., 2019). En contraste, la cinética de crecimiento del virus rPEDV-4RS-N2 fue significativamente más lenta que la del virus parental rPEDV-N2 y alcanzó títulos hasta 300 veces menores. Por tanto, nuestros datos preliminares sugieren que el virus PEDV era más sensible que el TGEV a las duplicaciones de las TRSs. Esta diferencia se podría deber a la combinación de dos factores. Por un lado, que se estuviese alterando en exceso la acumulación del mRNA-N2, con una secuencia distinta al del mRNA-N silvestre, cuyo efecto no se ha explorado completamente durante esta tesis doctoral. Por otro lado, se comprobó que la conservación de secuencia en las TRSs es menor en el caso del PEDV que en el caso del TGEV. Por tanto, la modificación de las TRSs podría estar dando lugar a la generación de sgRNAs alternativos nuevos, que pudiesen interferir con la replicación viral.

Sería conveniente analizar en el futuro si, partiendo de un virus PEDV recombinante atenuado que permita la supervivencia del 100% de los animales infectados con el virus rPEDV-N2, la combinación de ambas estrategias de atenuación resulta en un virus atenuado que replique eficientemente en el intestino. Para ello, se podría analizar la virulencia tanto del virus con cuatro entornos de las TRS modificados (rPEDV-4RS-N2), como la de los mutantes rPEDV-2RS-N2 y rPEDV-3RS-N2, con dos y 3 de las TRS modificadas. Estos experimentos tienen la dificultad de que requieren la evaluación en el hospedador natural del PEDV, en laboratorios de alta seguridad biológica, lo que es altamente costoso.

Como se ha descrito en la sección de resultados, los virus mutantes rPEDV- $\Delta$ E1-N2, rPEDV- $\Delta$ E2-N2 y rPEDV- $\Delta$ E3-N2, que incluyen pequeñas deleciones en el extremo carboxilo terminal de la proteína E, fueron eficientes en replicación pero defectivos en propagación. Estos datos sugieren que, en el caso de PEDV, el requerimiento de la proteína E es elevado, al igual que ocurre en TGEV o MERS-CoV (Almazan, F., y col., 2013;Ortego, J., y col., 2002). Curiosamente, se ha descrito un virus PEDV mutante que carece de cuatro aminoácidos en el dominio transmembrana de la proteína E (Sun, M., y col., 2017). Este virus es viable y crece en cultivos celulares con títulos similares a los del virus parental, aunque produce un incremento en citoquinas pro-inflamatorias y en la respuesta a estrés de retículo (Sun, M., y col., 2017). Esto sugiere que sería posible eliminar determinadas regiones de la proteína E de PEDV y obtener virus viables, potencialmente atenuados, que podrían ser candidatos a vacuna alternativos.

Así mismo, los mutantes con pequeñas deleciones en la proteína E (rPEDV- $\Delta$ E1-N2, rPEDV- $\Delta$ E2-N2 y rPEDV- $\Delta$ E3-N2) pueden ser la base del desarrollo de un replicón RNA del PEDV como candidato a vacuna que tendría la ventaja de ser una vacuna de un solo ciclo de replicación, basada en un RNA (no un virus con capacidad de diseminación). Podría ser suministrado en cápsidas virales o en el interior de diferentes polímeros (Zimmer, G., 2010). Este tipo de candidatos a vacuna son significativamente más seguros que los virus atenuados, debido a que replican el material genético viral pero no pueden revertir a la forma parental (Almazan, F., y col., 2014;Muhlebach, M. D.y Hutzler, S., 2017). Por otro lado, los replicones tienen la capacidad de introducirse en el interior de las células y expresar los genes responsables de la estimulación de la inmunogenicidad sin propagarse a otras células (Mogler, M. A., y col., 2014).

En resumen, el trabajo realizado durante esta tesis doctoral ha permitido la obtención de un candidato a vacuna para el PEDV, basado en un virus quimérico TGEV-PEDV. Además, se ha generado un cDNA infectivo de PEDV que ha facilitado la obtención de una colección de virus mutantes con distinto grado de virulencia, que serán la base del desarrollo de nuevos candidatos a vacuna. Los resultados obtenidos con los virus mutantes abren además nuevas vías de investigación para entender la patogénesis de PEDV, con implicaciones en el desarrollo tanto de vacunas como de posibles estrategias antivirales para éste u otros CoVs emergentes.

## ***CONCLUSIONES***

1. El virus recombinante rTGEV-RS-SPEDV, que expresa una proteína quimérica SPEDV-TGEV compuesta por el ectodominio de la proteína S del PEDV y el endominio de la del TGEV, y contiene duplicaciones en el entorno de las las secuencias que regulan la transcripción (TRSs), resultó atenuado.
2. El virus rTGEV-RS-SPEDV protegió a lechones jóvenes frente a la infección con una cepa virulenta de PEDV. La protección estaba asociada a la inducción de anticuerpos neutralizantes.
3. Se ha obtenido un cDNA infectivo para PEDV, basado en una cepa epidémica virulenta que circula en EE UU. El virus rPEDV-CM1, obtenido a partir de este clon infectivo, resultó virulento en lechones causando, una fuerte patología en el tracto entérico y la muerte del 50% de los animales infectados.
4. Con el fin de obtener virus PEDV atenuados que sean candidatos a vacuna se han generado cuatros virus rPEDV-NCPB por genética reversa, con cambios en los pares de bases de los codones (CPB) del gen de la proteína N, esencial para la replicación del virus. Los virus mutantes fueron viables y presentaron diferencias significativas con el virus parental en su crecimiento en cultivos celulares, síntesis de RNA viral o acumulación de la proteína N.

Los virus mutantes rPEDV-NCPB mostraron un amplio rango de virulencia. En algunos casos el efecto observado correlacionó con la menor replicación en el intestino. En otros casos, la virulencia estaba asociada con la respuesta inmune innata inducida por los virus mutantes.

5. El virus mutante rPEDV-N2 representa es un candidato prometedor para la obtención de una vacuna. Este virus replica eficientemente tanto en cultivos celulares como en el intestino de los animales y era atenuado, dado que el 100% de los animales inoculados con él sobrevivieron a la infección.
6. Se han generado virus rPEDV-N2 por genética reversa que incluyen duplicaciones de las TRSs de los genes 3, E, M y N de PEDV. Estos virus



## *Conclusiones*

fueron viables y mostraron cinéticas de crecimiento distintas a las del virus parental.

7. Los cDNAs infectivos, basados en el rPEDV-N2, que incluían deleciones en el gen de la proteína E, correspondieron a virus competentes en replicación y deficientes en propagación. Estos virus son candidatos de interés para la construcción de replicones RNA del PEDV útiles en la generación de vacunas altamente seguras basadas en virus de ciclo único.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

# A

---

- Akimkin, V., Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Hoper, D., Jenckel, M., Pohlmann, A.**, 2016. New chimeric porcine coronavirus in swine feces, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1314-1315
- Almazan, F., DeDiego, M. L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuñiga, S., Alonso, S., Moreno, J. L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L.**, 2006. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* **80**, 10900-10906
- Almazan, F., DeDiego, M. L., Sola, I., Zuñiga, S., Nieto-Torres, J. L., Marquez-Jurado, S., Andres, G., Enjuanes, L.**, 2013. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *MBio* **4**, e00650-00613
- Almazan, F., Galan, C., Enjuanes, L.**, 2004. The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* **78**, 12683-12688
- Almazan, F., Gonzalez, J. M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.**, 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5516-5521
- Almazan, F., Sola, I., Zuñiga, S., Marquez-Jurado, S., Morales, L., Becares, M., Enjuanes, L.**, 2014. Coronavirus reverse genetic systems: Infectious clones and replicons. *Virus Res.* **189**, 262-270
- Andreazza, S., Samstag, C. L., Sanchez-Martinez, A., Fernandez-Vizarra, E., Gomez-Duran, A., Lee, J. J., Tufi, R., Hipp, M. J., Schmidt, E. K., Nicholls, T. J., Gammage, P. A., Chinnery, P. F., Minczuk, M., Pallanck, L. J., Kennedy, S. R., Whitworth, A. J.**, 2019. Mitochondrially-targeted APOBEC1 is a potent mtDNA mutator affecting mitochondrial function and organismal fitness in *Drosophila*. *Nat Commun* **10**, 3280
- Annamalai, T., Lin, C. M., Gao, X., Liu, X., Lu, Z., Saif, L. J., Wang, Q.**, 2017. Cross protective immune responses in nursing piglets infected with a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus strain and challenged with an original US PEDV strain. *Vet. Res.* **48**, 61

- Annamalai, T., Saif, L. J., Lu, Z., Jung, K.**, 2015. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **168**, 193-202
- Annan, A., Baldwin, H. J., Corman, V. M., Klose, S. M., Owusu, M., Nkrumah, E. E., Badu, E. K., Anti, P., Agbenyega, O., Meyer, B., Oppong, S., Sarkodie, Y. A., Kalko, E. K., Lina, P. H., Godlevska, E. V., Reusken, C., Seebens, A., Gloza-Rausch, F., Vallo, P., Tschapka, M., Drosten, C., Drexler, J. F.**, 2013. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 456-459
- Anthony, S. J., Johnson, C. K., Greig, D. J., Kramer, S., Che, X., Wells, H., Hicks, A. L., Joly, D. O., Wolfe, N. D., Daszak, P., Karesh, W., Lipkin, W. I., Morse, S. S., Consortium, P., Mazet, J. A. K., Goldstein, T.**, 2017. Global patterns in coronavirus diversity. *Virus Evol* **3**, vex012
- Arndt, A. L., Larson, B. J., Hogue, B. G.**, 2010. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *J. Virol.* **84**, 11418-11428
- Assiri, A., Al-Tawfiq, J. A., Al-Rabeeah, A. A., Al-Rabiah, F. A., Al-Hajjar, S., Al-Barrak, A., Flemban, H., Al-Nassir, W. N., Balkhy, H. H., Al-Hakeem, R. F., Makhdoom, H. Q., Zumla, A. I., Memish, Z. A.**, 2013. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 752-761
- Ayudhya, S. N., Assavacheep, P., Thanawongnuwech, R.**, 2012. One world--one health: the threat of emerging swine diseases. An Asian perspective. *Transbound. Emerg. Dis.* **59 Suppl 1**, 9-17

## **B**

---

- Baek, P. S., Choi, H. W., Lee, S., Yoon, I. J., Lee, Y. J., Lee du, S., Lee, S., Lee, C.**, 2016. Efficacy of an inactivated genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus vaccine in neonatal piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **174**, 45-49

- Baez-Santos, Y. M., St John, S. E., Mesecar, A. D.,** 2015. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Res.* **115**, 21-38
- Balint, A., Farsang, A., Zadori, Z., Hornyak, A., Dencso, L., Almazan, F., Enjuanes, L., Belak, S.,** 2012. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus Strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. *J. Virol.* **86**, 6258-6267
- Ballesteros, M. L., Sanchez, C. M., Enjuanes, L.,** 1997. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology* **227**, 378-388
- Banerjee, A., Kulcsar, K., Misra, V., Frieman, M., Mossman, K.,** 2019. Bats and Coronaviruses. *Viruses* **11**,
- Beall, A., Yount, B., Lin, C. M., Hou, Y., Wang, Q., Saif, L., Baric, R.,** 2016. Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A. *MBio* **7**, e01451-01415
- Becares, M., Pascual-Iglesias, A., Nogales, A., Sola, I., Enjuanes, L., Zuñiga, S.,** 2016. Mutagenesis of coronavirus Nsp14 reveals its potential role in modulation of the innate immune response. *J. Virol.* **90**, 5399-5414
- Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., Whittaker, G. R.,** 2012. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* **4**, 1011-1033
- Belsham, G. J., Rasmussen, T. B., Normann, P., Vaclavek, P., Strandbygaard, B., Botner, A.,** 2016. Characterization of a novel chimeric swine enteric coronavirus from diseased pigs in Central Eastern Europe in 2016. *Transbound. Emerg. Dis.* **63**, 595-601
- Boniotti, M. B., Papetti, A., Bertasio, C., Giacomini, E., Lazzaro, M., Cerioli, M., Faccini, S., Bonilauri, P., Vezzoli, F., Lavazza, A., Alborali, G. L.,** 2018. Porcine Epidemic Diarrhoea Virus in Italy: Disease spread and the role of transportation. *Transbound Emerg Dis* **65**, 1935-1942
- Boniotti, M. B., Papetti, A., Lavazza, A., Alborali, G., Sozzi, E., Chiapponi, C., Faccini, S., Bonilauri, P., Cordioli, P., Marthaler, D.,** 2016. Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric coronavirus, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 83-87

**Brian, D. A., Baric, R. S.**, 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **287**, 1-30

**Brierley, I., Digard, P., Inglis, S. C.**, 1989. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**, 537-547

**Bukhari, K., Mulley, G., Gulyaeva, A. A., Zhao, L., Shu, G., Jiang, J., Neuman, B. W.**, 2018. Description and initial characterization of metatranscriptomic nidovirus-like genomes from the proposed new family Abysoviridae, and from a sister group to the Coronavirinae, the proposed genus Alphaletovirus. *Virology* **524**, 160-171

**Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T.**, 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611-622

## C

---

**Cao, L., Ge, X., Gao, Y., Herrler, G., Ren, Y., Ren, X., Li, G.**, 2015a. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon-beta production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway. *Virol. J.* **12**, 127

**Cao, L., Ge, X., Gao, Y., Ren, Y., Ren, X., Li, G.**, 2015b. Porcine epidemic diarrhea virus infection induces NF-kappaB activation through the TLR2, TLR3 and TLR9 pathways in porcine intestinal epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **96**, 1757-1767

**Casais, R., Thiel, V., Siddell, S. G., Cavanagh, D., Britton, P.**, 2001. Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Virol.* **75**, 12359-12369

**Cavanagh, D.**, 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* **34**, 439-448

**Chang, C. K., Sue, S. C., Yu, T. H., Hsieh, C. M., Tsai, C. K., Chiang, Y. C., Lee, S. J., Hsiao, H. H., Wu, W. J., Chang, W. L., Lin, C. H., Huang, T. H.**

2006. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *J. Biomed. Sci.* **13**, 59-72
- Chang, Y. C., Chang, C. Y., Tsai, P. S., Chiou, H. Y., Jeng, C. R., Pang, V. F., Chang, H. W.**, 2018. Efficacy of heat-labile enterotoxin B subunit- adjuvanted parenteral porcine epidemic diarrhea virus trimeric spike subunit vaccine in piglets. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 7499-7507
- Chang, Y. C., Kao, C. F., Chang, C. Y., Jeng, C. R., Tsai, P. S., Pang, V. F., Chiou, H. Y., Peng, J. Y., Cheng, I. C., Chang, H. W.**, 2017. Evaluation and comparison of the pathogenicity and host immune responses induced by a G2b Taiwan porcine epidemic diarrhea virus (Strain Pintung 52) and Its highly cell-culture passaged strain in conventional 5-week-old pigs. *Viruses* **9**, 121
- Chattha, K. S., Roth, J. A., Saif, L. J.**, 2015. Strategies for design and application of enteric viral vaccines. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **3**, 375-395
- Chen, Q., Gauger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., Madson, D., Brodie, J., Magstadt, D., Derscheid, R., Welch, M., Zhang, J.**, 2015. Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. *Virology* **482**, 51-59
- Choudhury, B., Dastjerdi, A., Doyle, N., Frossard, J. P., Steinbach, F.**, 2016. From the field to the lab - An European view on the global spread of PEDV. *Virus Res* **226**, 40-49
- Christensen, D., Mortensen, R., Rosenkrands, I., Dietrich, J., Andersen, P.**, 2017. Vaccine-induced Th17 cells are established as resident memory cells in the lung and promote local IgA responses. *Mucosal Immunol.* **10**, 260-270
- Coleman, C. M., Frieman, M. B.**, 2014. Coronaviruses: important emerging human pathogens. *J. Virol.* **88**, 5209-5212
- Coleman, J. R., Papamichail, D., Skiena, S., Futcher, B., Wimmer, E., Mueller, S.**, 2008a. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* **320**, 1784-1787
- Coleman, J. R., Papamichail, D., Skiena, S., Futcher, B., Wimmer, E., Mueller, S.**, 2008b. Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias. *Science* **320**, 1784-1787
- Coley, S. E., Lavi, E., Sawicki, S. G., Fu, L., Schelle, B., Karl, N., Siddell, S. G., Thiel, V.**, 2005. Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from

cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J. Virol.* **79**, 3097-3106

**Collin, E. A., Anbalagan, S., Okda, F., Batman, R., Nelson, E., Hause, B. M.,** 2015. An inactivated vaccine made from a U.S. field isolate of porcine epidemic disease virus is immunogenic in pigs as demonstrated by a dose-titration. *BMC Vet Res* **11**, 62

**Cong, Y., Li, X., Bai, Y., Lv, X., Herrler, G., Enjuanes, L., Zhou, X., Qu, B., Meng, F., Cong, C., Ren, X., Li, G.,** 2015. Porcine aminopeptidase N mediated polarized infection by porcine epidemic diarrhea virus in target cells. *Virology* **478C**, 1-8

**Conrad, S. J., Silva, R. F., Hearn, C. J., Climans, M., Dunn, J. R.,** 2018. Attenuation of Marek's disease virus by codon pair deoptimization of a core gene. *Virology* **516**, 219-226

**Correa, I., Jimenez, G., Sune, C., Bullido, M. J., Enjuanes, L.,** 1988. Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res.* **10**, 77-93

**Corse, E., Machamer, C. E.,** 2003. The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction. *Virology* **312**, 25-34

**Crawford, K., Lager, K. M., Kulshreshtha, V., Miller, L. C., Faaberg, K. S.,** 2016. Status of vaccines for porcine epidemic diarrhea virus in the United States and Canada. *Virus Res.* **226**, 108-116

**Cui, L., Wang, H., Ji, Y., Yang, J., Xu, S., Huang, X., Wang, Z., Qin, L., Tien, P., Zhou, X., Guo, D., Chen, Y.,** 2015. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. *J. Virol.* **89**, 9029-9043

**Curry, S. M., Burrough, E. R., Schwartz, K. J., Yoon, K. J., Lonergan, S. M., Gabler, N. K.,** 2018. Porcine epidemic diarrhea virus reduces feed efficiency in nursery pigs. *J Anim Sci* **96**, 85-97

**Curtis, K. M., Yount, B., Sims, A. C., Baric, R. S.,** 2004. Reverse genetic analysis of the transcription regulatory sequence of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **78**, 6061-6066



# D

---

- Dastjerdi, A., Carr, J., Ellis, R. J., Steinbach, F., Williamson, S.,** 2015. Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2235-2237
- de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., Holmes, K. V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P. J. M., Talbot, P. J., Woo, P. C. Y., Ziebuhr, J.,** 2012. Family Coronaviridae, en: King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., Lefkowitz, E. J., *Virus Taxonomy*. Elsevier, Amsterdam, pp. 774-796
- de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R. A., Galiano, M., Gorbalenya, A. E., Memish, Z. A., Perlman, S., Poon, L. L., Snijder, E. J., Stephens, G. M., Woo, P. C., Zaki, A. M., Zambon, M., Ziebuhr, J.,** 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* **87**, 7790-7792
- DeDiego, M. L., Nieto-Torres, J. L., Jimenez-Guardeño, J. M., Regla-Nava, J. A., Alvarez, E., Oliveros, J. C., Zhao, J., Fett, C., Perlman, S., Enjuanes, L.,** 2011. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS Pathog.* **7**, e1002315
- DeDiego, M. L., Nieto-Torres, J. L., Jimenez-Guardeño, J. M., Regla-Nava, J. A., Castaño-Rodríguez, C., Fernandez-Delgado, R., Usera, F., Enjuanes, L.,** 2014. Coronavirus virulence genes with main focus on SARS-CoV envelope gene. *Virus Res.* **194**, 124-137
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Norén, O., Laude, H.,** 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**, 417-420
- Delmas, B., Gelfi, J., Laude, H.,** 1986. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **67**, 1405-1418
- Delmas, B., Laude, H.,** 1990. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J. Virol.* **64**, 5367-5375
- Deng, F., Ye, G., Liu, Q., Navid, M. T., Zhong, X., Li, Y., Wan, C., Xiao, S., He, Q., Fu, Z. F., Peng, G.,** 2016. Identification and Comparison of Receptor

Binding Characteristics of the Spike Protein of Two Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strains. *Viruses* **8**, 55

**Deng, X., Hackbart, M., Mettelman, R. C., O'Brien, A., Mielech, A. M., Yi, G., Kao, C. C., Baker, S. C.**, 2017. Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E4251-E4260

**Deng, X., van Geelen, A., Buckley, A. C., O'Brien, A., Pillatzki, A., Lager, K. M., Faaberg, K. S., Baker, S. C.**, 2019. Coronavirus Endoribonuclease Activity in Porcine Epidemic Diarrhea Virus Suppresses Type I and Type III Interferon Responses. *J Virol* **93**,

**Diaz-San Segundo, F., Medina, G. N., Ramirez-Medina, E., Velazquez-Salinas, L., Koster, M., Grubman, M. J., de los Santos, T.**, 2016. Synonymous Deoptimization of Foot-and-Mouth Disease Virus Causes Attenuation In Vivo while Inducing a Strong Neutralizing Antibody Response. *J Virol* **90**, 1298-1310

**Ding, Z., Fang, L., Jing, H., Zeng, S., Wang, D., Liu, L., Zhang, H., Luo, R., Chen, H., Xiao, S.**, 2014. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *J. Virol.* **88**, 8936-8945

**Dominguez, S. R., O'Shea, T. J., Oko, L. M., Holmes, K. V.**, 2007. Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg Infect Dis* **13**, 1295-1300

**Donaldson, E. F., Yount, B., Sims, A. C., Burkett, S., Pickles, R. J., Baric, R. S.**, 2008. Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63. *J. Virol.* **82**, 11948-11957

**Doyle, L. P., Hutchings, L. M.**, 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **108**, 257-259

**Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H., Doerr, H. W.**, 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1967-1976

**Drosten, C., Kellam, P., Memish, Z. A.,** 2014. Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus. *N Engl J Med* **371**, 1359-1360

## E

---

**Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., Zuniga, S.,** 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu Rev Microbiol* **60**, 211-230

**Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., de Groot, R. J., Cowley, J. A., Ziebuhr, J., Snijder, E. J.,** 2008. The Nidovirales, en: Mahy, B. W. J., Van Regenmortel, M., Walker, P., Majumder-Russell, D., *Encyclopedia of Virology*, Third Edition. Elsevier Ltd., Oxford, pp. 419-430

**Enjuanes, L., Sola, I., Zuñiga, S., Moreno, J. L.,** 2007. Coronavirus RNA synthesis: Transcription, en: Thiel, V., *Coronaviruses: Molecular and cellular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 81-107

**Enjuanes, L., Van der Zeijst, B. A. M.,** 1995. Molecular basis of transmissible gastroenteritis coronavirus epidemiology, en: Siddell, S. G., *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, pp. 337-376

**Enjuanes, L., Zuñiga, S., Castaño-Rodríguez, C., Gutierrez-Alvarez, J., Canton, J., Sola, I.,** 2016. Molecular basis of coronavirus virulence and vaccine development. *Adv. Virus Res.* **96**, 245-286

**Eschke, K., Trimpert, J., Osterrieder, N., Kunec, D.,** 2018. Attenuation of a very virulent Marek's disease herpesvirus (MDV) by codon pair bias deoptimization. *PLoS Pathog* **14**, e1006857

**Evenson, D., Gerber, P. F., Xiao, C. T., Halbur, P. G., Wang, C., Tian, D., Ni, Y. Y., Meng, X. J., Opriessnig, T.,** 2016. A porcine reproductive and respiratory syndrome virus candidate vaccine based on the synthetic attenuated virus engineering approach is attenuated and effective in protecting against homologous virus challenge. *Vaccine* **34**, 5546-5553

## F

---

- Fan, B., Yu, Z., Pang, F., Xu, X., Zhang, B., Guo, R., He, K., Li, B.,** 2017. Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone of a virulent porcine epidemic diarrhea virus strain AH2012/12 in China. *Virology* **500**, 50-61
- Fehr, A. R., Channappanavar, R., Jankevicius, G., Fett, C., Zhao, J., Athmer, J., Meyerholz, D. K., Ahel, I., Perlman, S.,** 2016. The conserved coronavirus macrodomain promotes virulence and suppresses the innate immune response during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *MBio* **7**, e01721-01716
- Frieman, M., Ratia, K., Johnston, R. E., Mesecar, A. D., Baric, R. S.,** 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like protease ubiquitin-like domain and catalytic domain regulate antagonism of IRF3 and NF-kappaB signaling. *J. Virol.* **83**, 6689-6705
- Fu, X., Fang, B., Liu, Y., Cai, M., Jun, J., Ma, J., Bu, D., Wang, L., Zhou, P., Wang, H., Zhang, G.,** 2018. Newly emerged porcine enteric alphacoronavirus in southern China: Identification, origin and evolutionary history analysis. *Infect. Genet. Evol.* **62**, 179-187

## **G**

---

- Gallagher, T. M., Buchmeier, M. J.,** 2001. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* **279**, 371-374
- Gallien, S., Fablet, C., Bigault, L., Bernard, C., Toulouse, O., Berri, M., Blanchard, Y., Rose, N., Grasland, B.,** 2018. Lessons learnt from a porcine epidemic diarrhea (PED) case in France in 2014: Descriptive epidemiology and control measures implemented. *Vet Microbiol* **226**, 9-14
- Gao, L., Wang, L., Huang, C., Yang, L., Guo, X. K., Yu, Z., Liu, Y., Yang, P., Feng, W. H.,** 2015. HP-PRRSV is attenuated by de-optimization of codon pair bias in its RNA-dependent RNA polymerase nsp9 gene. *Virology* **485**, 135-144
- Garbino, J., Crespo, S., Aubert, J. D., Rochat, T., Ninet, B., Deffernez, C., Wunderli, W., Pache, J. C., Soccac, P. M., Kaiser, L.,** 2006. A prospective hospital-based study of the clinical impact of non-severe acute respiratory syndrome (Non-SARS)-related human coronavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1009-1015

- Gaunt, E., Wise, H. M., Zhang, H., Lee, L. N., Atkinson, N. J., Nicol, M. Q., Highton, A. J., Klenerman, P., Beard, P. M., Dutia, B. M., Digard, P., Simmonds, P.,** 2016. Elevation of CpG frequencies in influenza A genome attenuates pathogenicity but enhances host response to infection. *Elife* **5**, e12735
- Gillespie, T., Song, Q., Inskip, M., Stone, S., Murtaugh, M. P.,** 2018. Effect of Booster Vaccination with Inactivated Porcine Epidemic Diarrhea Virus on Neutralizing Antibody Response in Mammary Secretions. *Viral Immunol* **31**, 62-68
- Gimenez-Lirola, L. G., Zhang, J., Carrillo-Avila, J. A., Chen, Q., Magtoto, R., Poonsuk, K., Baum, D. H., Pineyro, P., Zimmerman, J.,** 2017. Reactivity of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Structural Proteins to Antibodies against Porcine Enteric Coronaviruses: Diagnostic Implications. *J Clin Microbiol* **55**, 1426-1436
- Gloza-Rausch, F., Ipsen, A., Seebens, A., Gottsche, M., Panning, M., Felix Drexler, J., Petersen, N., Annan, A., Grywna, K., Muller, M., Pfefferle, S., Drosten, C.,** 2008. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 626-631
- Goede, D., Murtaugh, M. P., Nerem, J., Yeske, P., Rossow, K., Morrison, R.,** 2015. Previous infection of sows with a "mild" strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a "severe" strain. *Vet. Microbiol.* **176**, 161-164
- Gong, L., Li, J., Zhou, Q., Xu, Z., Chen, L., Zhang, Y., Xue, C., Wen, Z., Cao, Y.,** 2017. A new bat-HKU2-like coronavirus in swine, China, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1607–1609
- Gonzalez, J. M., Penzes, Z., Almazan, F., Calvo, E., Enjuanes, L.,** 2002. Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by insertion of an intron. *J. Virol.* **76**, 4655-4661
- Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E. J.,** 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**, 17-37
- Graham, R. L., Donaldson, E. F., Baric, R. S.,** 2013. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 836-848

**Guo, X., Hu, H., Chen, F., Li, Z., Ye, S., Cheng, S., Zhang, M., He, Q.,** 2016. iTRAQ-based comparative proteomic analysis of Vero cells infected with virulent and CV777 vaccine strain-like strains of porcine epidemic diarrhea virus. *J. Proteomics* **130**, 65-75

**Gutman, G. A., Hatfield, G. W.,** 1989. Nonrandom utilization of codon pairs in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3699-3703

## H

---

**Ha, Y., Shin, J. H., Chae, C.,** 2010. Colostral transmission of porcine circovirus 2 (PCV-2): reproduction of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs fed milk from PCV-2-infected sows with post-natal porcine parvovirus infection or immunostimulation. *J Gen Virol* **91**, 1601-1608

**Hain, K. S., Joshi, L. R., Okda, F., Nelson, J., Singrey, A., Lawson, S., Martins, M., Pillatzki, A., Kutish, G. F., Nelson, E. A., Flores, E. F., Diel, D. G.,** 2016. Immunogenicity of a recombinant parapoxvirus expressing the spike protein of Porcine epidemic diarrhea virus. *J. Gen. Virol.* **97**, 2719-2731

**Hanson, G., Collier, J.,** 2018. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 20-30

**Heald-Sargent, T., Gallagher, T.,** 2012. Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses* **4**, 557-580

**Hernandez, P. P., Mahlakoiv, T., Yang, I., Schwierzeck, V., Nguyen, N., Guendel, F., Gronke, K., Ryffel, B., Hoelscher, C., Dumoutier, L., Renaud, J. C., Suerbaum, S., Staeheli, P., Diefenbach, A.,** 2015. Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection. *Nat. Immunol.* **16**, 698-707

**Hoang, H., Killian, M. L., Madson, D. M., Arruda, P. H., Sun, D., Schwartz, K. J., Yoon, K. J.,** 2013. Full-Length genome sequence of a plaque-cloned virulent Porcine Epidemic Diarrhea Virus isolate (USA/Iowa/18984/2013) from a Midwestern U.S. Swine Herd. *Genome Announc.* **1**, e01049-01013

**Hofmann, M., Wyler, R.,** 1988. Propagation of the Virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2235-2239

**Hou, Y., Ke, H., Kim, J., Yoo, D., Su, Y., Boley, P., Chepngeno, J., Vlasova, A. N., Saif, L. J., Wang, Q.,** 2019. Engineering a Live Attenuated Porcine

- Epidemic Diarrhea Virus Vaccine Candidate via Inactivation of the Viral 2'-O-Methyltransferase and the Endocytosis Signal of the Spike Protein. *J Virol* **93**, **Hu, Y., Li, W., Gao, T., Cui, Y., Jin, Y., Li, P., Ma, Q., Liu, X., Cao, C.**, 2017. The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Inhibits Type I Interferon Production by Interfering with TRIM25-Mediated RIG-I Ubiquitination. *J Virol* **91**,
- Huang, C., Ito, N., Tseng, C. T., Makino, S.**, 2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J. Virol.* **80**, 7287-7294
- Huang, C., Peters, C. J., Makino, S.**, 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus accessory protein 6 is a virion-associated protein and is released from 6 protein-expressing cells. *J. Virol.* **81**, 5423-5426

## J

---

- Jacobs, L., Van der Zeijst, B. A. M., Horzinek, M.**, 1986. Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.* **57**, 1010-1015
- Janetanakit, T., Lumyai, M., Bunpapong, N., Boonyapisitsopa, S., Chaiyawong, S., Nonthabenjawan, N., Kesdaengsakonwut, S., Amonsin, A.**, 2016. Porcine Deltacoronavirus, Thailand, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 757-759
- Jauregui, A. R., Savalia, D., Lowry, V. K., Farrell, C. M., Wathelet, M. G.**, 2013. Identification of residues of SARS-CoV nsp1 that differentially affect inhibition of gene expression and antiviral signaling. *PLoS One* **8**, e62416
- Jengarn, J., Wongthida, P., Wanasen, N., Frantz, P. N., Wanitchang, A., Jongkaewwattana, A.**, 2015. Genetic manipulation of porcine epidemic diarrhoea virus recovered from a full-length infectious cDNA clone. *J. Gen. Virol.* **96**, 2206-2218
- Jimenez, G., Correa, I., Melgosa, M. P., Bullido, M. J., Enjuanes, L.**, 1986. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* **60**, 131-139
- Jimenez-Guardeno, J. M., Regla-Nava, J. A., Nieto-Torres, J. L., DeDiego, M. L., Castano-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., Perlman,**

**S.,Enjuanes, L.**, 2015. Identification of the mechanisms causing reversion to virulence in an attenuated SARS-CoV for the design of a genetically stable vaccine. *PLoS Pathog.* **11**, e1005215

**Jimenez-Guardeño, J. M., Nieto-Torres, J. L., DeDiego, M. L., Regla-Nava, J. A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C.,Enjuanes, L.**, 2014. The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein Is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004320

**Jung, K.,Saif, L. J.**, 2017. Goblet cell depletion in small intestinal villous and crypt epithelium of conventional nursing and weaned pigs infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Res Vet Sci* **110**, 12-15

**Jung, K.,Saif, L. J.**, 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet. J.* **204**, 134-143

## K

---

**Kaewborisuth, C., He, Q.,Jongkaewwattana, A.**, 2018. The Accessory Protein ORF3 Contributes to Porcine Epidemic Diarrhea Virus Replication by Direct Binding to the Spike Protein. *Viruses* **10**,

**Kaewborisuth, C., Yingchutrakul, Y., Roytrakul, S.,Jongkaewwattana, A.**, 2019. Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) ORF3 Interactome Reveals Inhibition of Virus Replication by Cellular VPS36 Protein. *Viruses* **11**,

**Kamau, A. N., Park, J. E., Park, E. S., Yu, J. E., Rho, J.,Shin, H. J.**, 2017. Porcine amino peptidase N domain VII has critical role in binding and entry of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* **227**, 150-157

**Kao, C. F., Chiou, H. Y., Chang, Y. C., Hsueh, C. S., Jeng, C. R., Tsai, P. S., Cheng, I. C., Pang, V. F.,Chang, H. W.**, 2018. The Characterization of Immunoprotection Induced by a cDNA Clone Derived from the Attenuated Taiwan Porcine Epidemic Diarrhea Virus Pintung 52 Strain. *Viruses* **10**,

**Kaplan, B. S., Souza, C. K., Gauger, P. C., Stauff, C. B., Robert Coleman, J., Mueller, S.,Vincent, A. L.**, 2018. Vaccination of pigs with a codon-pair bias de-optimized live attenuated influenza vaccine protects from homologous challenge. *Vaccine* **36**, 1101-1107



- Ke, Y., Yu, D., Zhang, F., Gao, J., Wang, X., Fang, X., Wang, H., Sun, T.,** 2019. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing the spike protein of genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus: A platform for vaccine development against emerging epidemic isolates. *Virology* **533**, 77-85
- Kim, H., Lee, Y. K., Kang, S. C., Han, B. K., Choi, K. M.,** 2016. Recent vaccine technology in industrial animals. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **5**, 12-18
- Kim, L., Hayes, J., Lewis, P., Parwani, A. V., Chang, K. O., Saif, L. J.,** 2000. Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.* **145**, 1133-1147
- Kim, S. H., Cho, B. H., Lee, K. Y., Jang, Y. S.,** 2018. N-terminal Domain of the Spike Protein of Porcine Epidemic Diarrhea Virus as a New Candidate Molecule for a Mucosal Vaccine. *Immune Netw* **18**, e21
- Kindler, E., Gil-Cruz, C., Spanier, J., Li, Y., Wilhelm, J., Rabouw, H. H., Züst, R., Hwang, M., V'Kovski, P., Stalder, H., Marti, S., Habjan, M., Cervantes-Barragan, L., Elliot, R., Karl, N., Gaughan, C., van Kuppeveld, F. J., Silverman, R. H., Keller, M., Ludewig, B., Bergmann, C. C., Ziebuhr, J., Weiss, S. R., Kalinke, U., Thiel, V.,** 2017. Early endonuclease-mediated evasion of RNA sensing ensures efficient coronavirus replication. *PLoS Pathog.* **13**, e1006195
- Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S. H., Zevenhoven-Dobbe, J. C., van der Meer, Y., Koster, A. J., Mommaas, A. M., Snijder, E. J.,** 2008. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **6**, e226
- Kopecky-Bromberg, S. A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R. A., Palese, P.,** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol.* **81**, 548-557
- Kunec, D., Osterrieder, N.,** 2016. Codon Pair Bias Is a Direct Consequence of Dinucleotide Bias. *Cell Rep* **14**, 55-67
- Kuo, L., Godeke, G.-J., Raamsman, M. J. B., Masters, P. S., Rottier, P. J. M.,** 2000. Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J. Virol.* **74**, 1393-1406

## L

---

- Lai, M. M. C., Cavanagh, D.**, 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **48**, 1-100
- Lai, M. M. C., Perlman, S., Anderson, L.**, 2007. Coronaviridae, en: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E., *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins., pp.
- Langel, S. N., Paim, F. C., Alhamo, M. A., Buckley, A., Van Geelen, A., Lager, K. M., Vlasova, A. N., Saif, L. J.**, 2019. Stage of Gestation at Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection of Pregnant Swine Impacts Maternal Immunity and Lactogenic Immune Protection of Neonatal Suckling Piglets. *Front Immunol* **10**, 727
- Langel, S. N., Paim, F. C., Lager, K. M., Vlasova, A. N., Saif, L. J.**, 2016. Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): Historical and current concepts. *Virus Res.* **226**, 93-107
- Lauber, C., Ziebuhr, J., Junglen, S., Drosten, C., Zirkel, F., Nga, P. T., Morita, K., Snijder, E. J., Gorbalenya, A. E.**, 2012. Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Arch. Virol.* **157**, 1623-1628
- Laude, H., Masters, P. S.**, 1995. The coronavirus nucleocapsid protein, en: Siddell, S. G., *The coronaviridae*. Plenum press, New York, pp. 141-158
- Lawhorne, L. W.**, 1999. End-of-life care in the nursing home--is a good death compatible with regulatory compliance? *Bioethics Forum* **15**, 23-28
- Le Nouen, C., Brock, L. G., Luongo, C., McCarty, T., Yang, L., Mehedi, M., Wimmer, E., Mueller, S., Collins, P. L., Buchholz, U. J., DiNapoli, J. M.**, 2014. Attenuation of human respiratory syncytial virus by genome-scale codon-pair deoptimization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13169-13174
- Le Nouen, C., Collins, P. L., Buchholz, U. J.**, 2019. Attenuation of Human Respiratory Viruses by Synonymous Genome Recoding. *Front Immunol* **10**, 1250
- Lee, J., Storch, G. A.**, 2014. Characterization of human coronavirus OC43 and human coronavirus NL63 infections among hospitalized children <5 years of age. *Pediatr Infect Dis J* **33**, 814-820

- Lee, S., Son, K. Y., Noh, Y. H., Lee, S. C., Choi, H. W., Yoon, I. J., Lee, C.,** 2017. Genetic characteristics, pathogenicity, and immunogenicity associated with cell adaptation of a virulent genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* **207**, 248-258
- Lee, S. H., Yang, D. K., Kim, H. H., Cho, I. S.,** 2018. Efficacy of inactivated variant porcine epidemic diarrhea virus vaccines in growing pigs. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **7**, 61-69
- Li, B., Du, L., Yu, Z., Sun, B., Xu, X., Fan, B., Guo, R., Yuan, W., He, K.,** 2017. Poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticle-entrapped vaccine induces a protective immune response against porcine epidemic diarrhea virus infection in piglets. *Vaccine* **35**, 7010-7017
- Li, B. X., Ge, J. W., Li, Y. J.,** 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* **365**, 166-172
- Li, C. K., Wu, H., Yan, H., Ma, S., Wang, L., Zhang, M., Tang, X., Temperton, N. J., Weiss, R. A., Brenchley, J. M., Douek, D. C., Mongkolsapaya, J., Tran, B. H., Lin, C. L., Screaton, G. R., Hou, J. L., McMichael, A. J., Xu, X. N.,** 2008. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J. Immunol.* **181**, 5490-5500
- Li, F.,** 2016. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol.* **3**, 237-261
- Li, J., Jin, Z., Gao, Y., Zhou, L., Ge, X., Guo, X., Han, J., Yang, H.,** 2017. Development of the full-length cDNA clones of two porcine epidemic diarrhea disease virus isolates with different virulence. *PLoS One* **12**, e0173998
- Li, L., Fu, F., Xue, M., Chen, W., Liu, J., Shi, H., Chen, J., Bu, Z., Feng, L., Liu, P.,** 2017. IFN-lambda preferably inhibits PEDV infection of porcine intestinal epithelial cells compared with IFN-alpha. *Antiviral Res.* **140**, 76-82
- Li, P., Ke, X., Wang, T., Tan, Z., Luo, D., Miao, Y., Sun, J., Zhang, Y., Liu, Y., Hu, Q., Xu, F., Wang, H., Zheng, Z.,** 2018. Zika Virus Attenuation by Codon Pair Deoptimization Induces Sterilizing Immunity in Mouse Models. *J Virol* **92**,
- Li, Q., Peng, O., Wu, T., Xu, Z., Huang, L., Zhang, Y., Xue, C., Wen, Z., Zhou, Q., Cao, Y.,** 2018. PED subunit vaccine based on COE domain replacement of flagellin domain D3 improved specific humoral and mucosal immunity in mice. *Vaccine* **36**, 1381-1388

- Li, R., Qiao, S., Yang, Y., Guo, J., Xie, S., Zhou, E.,Zhang, G.,** 2016. Genome sequencing and analysis of a novel recombinant porcine epidemic diarrhea virus strain from Henan, China. *Virus Genes* **52**, 91-98
- Li, W., Hulswit, R. J. G., Kenney, S. P., Widjaja, I., Jung, K., Alhamo, M. A., van Dieren, B., van Kuppeveld, F. J. M., Saif, L. J.,Bosch, B. J.,** 2018. Broad receptor engagement of an emerging global coronavirus may potentiate its diverse cross-species transmissibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E5135-E5143
- Li, Y., Wang, G., Wang, J., Man, K.,Yang, Q.,** 2017. Cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus strain Zhejiang08 provides effective immune protection attributed to dendritic cell stimulation. *Vaccine* **35**, 7033-7041
- Likai, J., Shasha, L., Wenxian, Z., Jingjiao, M., Jianhe, S., Hengan, W.,Yaxian, Y.,** 2019. Porcine Deltacoronavirus Nucleocapsid Protein Suppressed IFN-beta Production by Interfering Porcine RIG-I dsRNA-Binding and K63-Linked Polyubiquitination. *Front Immunol* **10**, 1024
- Lin, C. M., Gao, X., Oka, T., Vlasova, A. N., Esseili, M. A., Wang, Q.,Saif, L. J.,** 2015. Antigenic relationships among Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Transmissible Gastroenteritis Virus strains. *J .Virol.* **89**, 3332-3342
- Lin, C. M., Ghimire, S., Hou, Y., Boley, P., Langel, S. N., Vlasova, A. N., Saif, L. J.,Wang, Q.,** 2019. Pathogenicity and immunogenicity of attenuated porcine epidemic diarrhea virus PC22A strain in conventional weaned pigs. *BMC Vet. Res.* **15**, 26
- Lin, C. M., Hou, Y., Marthaler, D., Gao, X., Liu, X., Zheng, L., Saif, L. J.,Wang, Q.,** 2017. Attenuation of an original US porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A via serial cell culture passage. *Vet. Microbiol.* **201**, 62-71
- Lin, C. M., Saif, L. J., Marthaler, D.,Wang, Q.,** 2016. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Res.* **226**, 20-39
- Liu, C., Tang, J., Ma, Y., Liang, X., Yang, Y., Peng, G., Qi, Q., Jiang, S., Li, J., Du, L.,Li, F.,** 2015. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J. Virol.* **89**, 6121-6125
- Liu, Y. V., Massare, M. J., Barnard, D. L., Kort, T., Nathan, M., Wang, L.,Smith, G.,** 2011. Chimeric severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S glycoprotein and influenza matrix 1 efficiently form virus-like

particles (VLPs) that protect mice against challenge with SARS-CoV. *Vaccine* **29**, 6606-6613

**Livak, K. J., Schmittgen, T. D.**, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408

**Liwnaree, B., Narkpuk, J., Sungsuwan, S., Jongkaewwattana, A., Jaru-Ampornpan, P.**, 2019. Growth enhancement of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Vero E6 cells expressing PEDV nucleocapsid protein. *PLoS One* **14**, e0212632

## M

---

**Madson, D. M., Arruda, P. H., Magstadt, D. R., Burrough, E. R., Hoang, H., Sun, D., Bower, L. P., Bhandari, M., Gauger, P. C., Stevenson, G. W., Wilberts, B. L., Wang, C., Zhang, J., Yoon, K. J.**, 2016. Characterization of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Isolate US/Iowa/18984/2013 Infection in 1-Day-Old Cesarean-Derived Colostrum-Deprived Piglets. *Vet Pathol* **53**, 44-52

**Madson, D. M., Magstadt, D. R., Arruda, P. H., Hoang, H., Sun, D., Bower, L. P., Bhandari, M., Burrough, E. R., Gauger, P. C., Pillatzki, A. E., Stevenson, G. W., Wilberts, B. L., Brodie, J., Harmon, K. M., Wang, C., Main, R. G., Zhang, J., Yoon, K. J.**, 2014. Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. *Vet Microbiol* **174**, 60-68

**Maeda, J., Repass, J. F., Maeda, A., Makino, S.**, 2001. Membrane topology of coronavirus E protein. *Virology* **281**, 163-169

**Makadiya, N., Brownlie, R., van den Hurk, J., Berube, N., Allan, B., Gerdt, V., Zakhartchouk, A.**, 2016. S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virol. J.* **13**, 57

**Mandelik, R., Sarvas, M., Jackova, A., Salamunova, S., Novotny, J., Vilcek, S.**, 2018. First outbreak with chimeric swine enteric coronavirus (SeCoV) on pig farms in Slovakia - lessons to learn. *Acta Vet Hung* **66**, 488-492

**Marthaler, D., Raymond, L., Jiang, Y., Collins, J., Rossow, K., Rovira, A.**, 2014. Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1347-1350

- Martinez, M. A., Jordan-Paiz, A., Franco, S., Nevot, M.,** 2016. Synonymous Virus Genome Recoding as a Tool to Impact Viral Fitness. *Trends Microbiol* **24**, 134-147
- Masters, P. S.,** 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* **66**, 193-292
- Mateos-Gomez, P. A., Morales, L., Zuniga, S., Enjuanes, L., Sola, I.,** 2013. Long-distance RNA-RNA interactions in the coronavirus genome form high-order structures promoting discontinuous RNA synthesis during transcription. *J Virol* **87**, 177-186
- Mateos-Gomez, P. A., Zuniga, S., Palacio, L., Enjuanes, L., Sola, I.,** 2011. Gene N proximal and distal RNA motifs regulate coronavirus nucleocapsid mRNA transcription. *J Virol* **85**, 8968-8980
- McBride, R., van Zyl, M., Fielding, B. C.,** 2014. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* **6**, 2991-3018
- McClurkin, A. W., Norman, J. O.,** 1966. Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* **30**, 190-198
- Menachery, V. D., Mitchell, H. D., Cockrell, A. S., Gralinski, L. E., Yount, B. L., Jr., Graham, R. L., McAnarney, E. T., Douglas, M. G., Scobey, T., Beall, A., Dinnon, K., 3rd, Kocher, J. F., Hale, A. E., Stratton, K. G., Waters, K. M., Baric, R. S.,** 2017. MERS-CoV Accessory ORFs play key role for infection and pathogenesis. *MBio* **8**, e00665-00617
- Menachery, V. D., Yount, B. L., Jr., Josset, L., Gralinski, L. E., Scobey, T., Agnihothram, S., Katze, M. G., Baric, R. S.,** 2014. Attenuation and restoration of severe acute respiratory syndrome coronavirus mutant lacking 2'-O-methyltransferase activity. *J. Virol.* **88**, 4251-4264
- Miura, T. A., Travanty, E. A., Oko, L., Bielefeldt-Ohmann, H., Weiss, S. R., Beauchemin, N., Holmes, K. V.,** 2008. The spike glycoprotein of murine coronavirus MHV-JHM mediates receptor-independent infection and spread in the central nervous systems of *Ceacam1a*<sup>-/-</sup> Mice. *J. Virol.* **82**, 755-763
- Mueller, S., Coleman, J. R., Papamichail, D., Ward, C. B., Nimnual, A., Fletcher, B., Skiena, S., Wimmer, E.,** 2010a. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nat Biotechnol* **28**, 723-726

- Mueller, S., Coleman, J. R., Papamichail, D., Ward, C. B., Nimnual, A., Futcher, B., Skiena, S., Wimmer, E., 2010b.** Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nat. Biotechnol.* **28**, 723-726
- Muhlebach, M. D., Hutzler, S., 2017.** Development of Recombinant Measles Virus-Based Vaccines. *Methods Mol Biol* **1581**, 151-168
- Muller, M. A., van der Hoek, L., Voss, D., Bader, O., Lehmann, D., Schulz, A. R., Kallies, S., Suliman, T., Fielding, B. C., Drosten, C., Niedrig, M., 2010.** Human coronavirus NL63 open reading frame 3 encodes a virion-incorporated N-glycosylated membrane protein. *Viol. J.* **7**, 6

## N

---

- Narayanan, K., Makino, S., 2001.** Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA Packaging. *J. Virol.* **75**, 9059-9067
- Narayanan, K., Ramirez, S. I., Lokugamage, K. G., Makino, S., 2015.** Coronavirus nonstructural protein 1: Common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus Res.* **202**, 89-100
- Neuman, B. W., Chamberlain, P., Bowden, F., Joseph, J., 2014.** Atlas of coronavirus replicase structure. *Virus Res.* **194**, 49-66
- Nguyen, V. P., Hogue, B. G., 1997.** Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.* **71**, 9278-9284
- Ni, Y. Y., Zhao, Z., Opriessnig, T., Subramaniam, S., Zhou, L., Cao, D., Cao, Q., Yang, H., Meng, X. J., 2014.** Computer-aided codon-pairs deoptimization of the major envelope GP5 gene attenuates porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* **450-451**, 132-139
- Niederwerder, M. C., Hesse, R. A., 2018.** Swine enteric coronavirus disease: A review of 4 years with porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus in the United States and Canada. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, 660-675
- Nieto-Torres, J. L., Dediego, M. L., Alvarez, E., Jimenez-Guardeno, J. M., Regla-Nava, J. A., Llorente, M., Kremer, L., Shuo, S., Enjuanes, L., 2011.** Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* **415**, 69-82

- Nieto-Torres, J. L., Dediego, M. L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeño, J. M., Regla-Nava, J. A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodriguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilera, V. M., Enjuanes, L., 2014.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004077
- Nieto-Torres, J. L., Verdia-Baguena, C., Jimenez-Guardeno, J. M., Regla-Nava, J. A., Castano-Rodriguez, C., Fernandez-Delgado, R., Torres, J., Aguilera, V. M., Enjuanes, L., 2015.** Severe acute respiratory syndrome coronavirus E protein transports calcium ions and activates the NLRP3 inflammasome. *Virology* **485**, 330-339

## O

---

- Oh, J., Lee, K. W., Choi, H. W., Lee, C., 2014.** Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Arch. Virol.* **159**, 2977-2987
- Oh, J. S., Song, D. S., Park, B. K., 2003.** Identification of a putative cellular receptor 150 kDa polypeptide for porcine epidemic diarrhea virus in porcine enterocytes. *J. Vet. Sci.* **4**, 269-275
- Oh, T., Kim, H., Park, K. H., Jeong, J., Yang, S., Kang, I., Park, S. J., Chae, C., 2019.** A comparative study of the efficacy of a porcine reproductive and respiratory syndrome subunit and a modified-live virus vaccine against respiratory diseases in endemic farms. *Can J Vet Res* **83**, 110-121
- Oka, T., Saif, L. J., Marthaler, D., Esseili, M. A., Meulia, T., Lin, C. M., Vlasova, A. N., Jung, K., Zhang, Y., Wang, Q., 2014.** Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet. Microbiol.* **173**, 258-269
- Opriessnig, T., Gerber, P. F., Shen, H., de Castro, A., Zhang, J., Chen, Q., Halbur, P., 2017a.** Evaluation of the efficacy of a commercial inactivated genogroup 2b-based porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine and experimental live genogroup 1b exposure against 2b challenge. *Vet Res* **48**, 69



- Opriessnig, T., Gerber, P. F., Shen, H., de Castro, A., Zhang, J., Chen, Q., Halbur, P., 2017b.** Evaluation of the efficacy of a commercial inactivated genogroup 2b-based porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine and experimental live genogroup 1b exposure against 2b challenge. *Vet. Res.* **48**, 69
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H., Enjuanes, L., 2002.** Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* **76**, 11518-11529
- Ortego, J., Sola, I., Almazan, F., Ceriani, J. E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana, J., Enjuanes, L., 2003.** Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. *Virology* **308**, 13-22
- Oszvald, M., Kang, T. J., Tomoskozi, S., Tamas, C., Tamas, L., Kim, T. G., Yang, M. S., 2007.** Expression of a synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of Escherichia coli heat labile enterotoxin in rice endosperm. *Mol Biotechnol* **35**, 215-223

## P

---

- Page, K. W., Britton, P., Boursnell, M. E. G., 1990.** Sequence analysis of the leader RNA of two porcine coronaviruses: transmissible gastroenteritis coronavirus and porcine respiratory coronavirus. *Virus Genes* **4**, 289-301
- Pan, Y., Tian, X., Qin, P., Wang, B., Zhao, P., Yang, Y. L., Wang, L., Wang, D., Song, Y., Zhang, X., Huang, Y. W., 2017.** Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Vet. Microbiol.* **211**, 15-21
- Papaneri, A. B., Johnson, R. F., Wada, J., Bollinger, L., Jahrling, P. B., Kuhn, J. H., 2015.** Middle East respiratory syndrome: obstacles and prospects for vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines* **14**, 949-962
- Park, S. J., Kim, H. K., Song, D. S., An, D. J., Park, B. K., 2012.** Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart. *J. Virol.* **86**, 5964
- Pascual-Iglesias, A., Sanchez, C. M., Penzes, Z., Sola, I., Enjuanes, L., Zuniga, S., 2019.** Recombinant Chimeric Transmissible Gastroenteritis

Virus (TGEV) - Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) Virus Provides Protection against Virulent PEDV. *Viruses* **11**,

**Pasternak, A. O., Spaan, W. J., Snijder, E. J.**, 2006. Nidovirus transcription: how to make sense? *J. Gen. Virol.* **87**, 1403-1421

**Paudel, S., Park, J. E., Jang, H., Hyun, B. H., Yang, D. G., Shin, H. J.**, 2014. Evaluation of antibody response of killed and live vaccines against porcine epidemic diarrhea virus in a field study. *Vet. Q.* **34**, 194-200

**Peng, T. Y., Lee, K. R., Tarn, W. Y.**, 2008. Phosphorylation of the arginine/serine dipeptide-rich motif of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein modulates its multimerization, translation inhibitory activity and cellular localization. *FEBS J.* **275**, 4152-4163

**Pensaert, M., Van Reeth, K.**, 1998. Porcine epidemic diarrhea and porcine respiratory coronavirus. *Proc. Ame. Ass. Swi. Pract.* 433-436

**Pensaert, M. B., De Bouck, P.**, 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* **58**, 243-247

**Pensaert, M. B., Martelli, P.**, 2016. Porcine epidemic diarrhea: A retrospect from Europe and matters of debate. *Virus Res.* **226**, 1-6

**Perlman, S., Netland, J.**, 2009. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 439-450

**Phillips, J. J., Chua, M. M., Lavi, E., Weiss, S. R.**, 1999. Pathogenesis of chimeric MHV4/MHV-A59 recombinant viruses: the murine coronavirus spike protein is a major determinant of neurovirulence. *J. Virol.* **73**, 7752-7760

**Poonsuk, K., Zhang, J., Chen, Q., Gonzalez, W., da Silva Carrion, L. C., Sun, Y., Ji, J., Wang, C., Main, R., Zimmerman, J., Gimenez-Lirola, L.**, 2016. Quantifying the effect of lactogenic antibody on porcine epidemic diarrhea virus infection in neonatal piglets. *Vet. Microbiol.* **197**, 83-92

**Posthuma, C. C., Te Velhuis, A. J. W., Snijder, E. J.**, 2017. Nidovirus RNA polymerases: Complex enzymes handling exceptional RNA genomes. *Virus Res* **234**, 58-73

**Pott, J., Mahlakoiv, T., Mordstein, M., Duerr, C. U., Michiels, T., Stockinger, S., Staeheli, P., Hornef, M. W.**, 2011. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7944-7949

## R

---

**Rappuoli, R.**, 2014. Vaccines: science, health, longevity, and wealth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 12282

**Regla-Nava, J. A., Nieto-Torres, J. L., Jimenez-Guardeno, J. M., Fernandez-Delgado, R., Fett, C., Castano-Rodriguez, C., Perlman, S., Enjuanes, L., DeDiego, M. L.**, 2015. Severe acute respiratory syndrome coronaviruses with mutations in the E protein are attenuated and promising vaccine candidates. *J. Virol.* **89**, 3870-3887

**Ribes, J. M., Ortego, J., Ceriani, J., Montava, R., Enjuanes, L., Buesa, J.**, 2011. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV)-based vectors with engineered murine tropism express the rotavirus VP7 protein and immunize mice against rotavirus. *Virology* **410**, 107-118

**Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campganioli, R., Icenogle, J. P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.-H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. d., Peret, T. C. T., Burns, C., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rassmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D. M. E., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., Bellini, W. J.**, 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1394-1399

**Ruch, T. R., Machamer, C. E.**, 2012. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses* **4**, 363-382

## S

---

**Saberi, A., Gulyaeva, A. A., Brubacher, J. L., Newmark, P. A., Gorbalenya, A. E.**, 2018. A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size. *PLoS Pathog* **14**, e1007314

**Salanueva, I. J., Carrascosa, J. L., Risco, C.**, 1999. Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.* **73**, 7952-7964

**Sanchez, C. M., Izeta, A., Sanchez-Morgado, J. M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.**, 1999. Targeted recombination

demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J. Virol.* **73**, 7607-7618

**Sato, T., Oroku, K., Ohshima, Y., Furuya, Y., Sasakawa, C.**, 2018. Efficacy of genogroup 1 based porcine epidemic diarrhea live vaccine against genogroup 2 field strain in Japan. *Virol J* **15**, 28

**Sato, T., Takeyama, N., Katsumata, A., Tuchiya, K., Kodama, T., Kusanagi, K.**, 2011. Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo. *Virus Genes* **43**, 72-78

**Sawicki, S. G., Sawicki, D. L.**, 1990. Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J. Virol.* **64**, 1050-1056

**Sawicki, S. G., Sawicki, D. L., Siddell, S. G.**, 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**, 20-29

**Schaecher, S. R., Mackenzie, J. M., Pekosz, A.**, 2007. The ORF7b protein of SARS-CoV is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J. Virol.* **81**, 718-731

**Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S. G., Thiel, V.**, 2005. Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J. Virol.* **79**, 6620-6630

**Schulz, L. L., Tonsor, G. T.**, 2015. Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States. *J Anim Sci* **93**, 5111-5118

**Scobey, T., Yount, B. L., Sims, A. C., Donaldson, E. F., Agnihothram, S. S., Menachery, V. D., Graham, R. L., Swanstrom, J., Bove, P. F., Kim, J. D., Grego, S., Randell, S. H., Baric, R. S.**, 2013. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 16157-16162

**Scott, A., McCluskey, B., Brown-Reid, M., Grear, D., Pitcher, P., Ramos, G., Spencer, D., Singrey, A.**, 2016. Porcine epidemic diarrhea virus introduction into the United States: Root cause investigation. *Prev. Vet. Med.* **123**, 192-201

**Sehrawat, S., Rouse, B. T.**, 2017. Interplay of regulatory T cell and Th17 cells during infectious diseases in humans and animals. *Front. Immunol.* **8**, 341

- Sevajol, M., Subissi, L., Decroly, E., Canard, B., Imbert, I.,** 2014. Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res.* **194**, 90-99
- Shan, Y., Liu, Z. Q., Li, G. W., Chen, C., Luo, H., Liu, Y. J., Zhuo, X. H., Shi, X. F., Fang, W. H., Li, X. L.,** 2018. Nucleocapsid protein from porcine epidemic diarrhea virus isolates can antagonize interferon-lambda production by blocking the nuclear factor-kappaB nuclear translocation. *J Zhejiang Univ Sci B* **19**, 570-580
- Sheahan, T., Rockx, B., Donaldson, E., Corti, D., Baric, R.,** 2008. Pathways of cross-species transmission of synthetically reconstructed zoonotic severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* **82**, 8721-8732
- Shen, S., Lin, P. S., Chao, Y. C., Zhang, A., Yang, X., Lim, S. G., Hong, W., Tan, Y. J.,** 2005. The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 286-292
- Shen, S. H., Stauff, C. B., Gorbatshevych, O., Song, Y., Ward, C. B., Yurovsky, A., Mueller, S., Fitcher, B., Wimmer, E.,** 2015. Large-scale recoding of an arbovirus genome to rebalance its insect versus mammalian preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 4749-4754
- Shi, D., Shi, H., Sun, D., Chen, J., Zhang, X., Wang, X., Zhang, J., Ji, Z., Liu, J., Cao, L., Zhu, X., Yuan, J., Dong, H., Wang, X., Chang, T., Liu, Y., Feng, L.,** 2017. Nucleocapsid Interacts with NPM1 and Protects it from Proteolytic Cleavage, Enhancing Cell Survival, and is Involved in PEDV Growth. *Sci Rep* **7**, 39700
- Shi, M., Lin, X. D., Chen, X., Tian, J. H., Chen, L. J., Li, K., Wang, W., Eden, J. S., Shen, J. J., Liu, L., Holmes, E. C., Zhang, Y. Z.,** 2018. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* **556**, 197-202
- Shi, P., Su, Y., Li, R., Liang, Z., Dong, S., Huang, J.,** 2019. PEDV nsp16 negatively regulates innate immunity to promote viral proliferation. *Virus Res* **265**, 57-66
- Shirato, K., Maejima, M., Islam, M. T., Miyazaki, A., Kawase, M., Matsuyama, S., Taguchi, F.,** 2016. Porcine aminopeptidase N is not a cellular receptor of porcine epidemic diarrhea virus, but promotes its infectivity via aminopeptidase activity. *J Gen Virol* **97**, 2528-2539

**Siddell, S. G., Walker, P. J., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adams, M. J., Dutilh, B. E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Junglen, S., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Nibert, M., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfacon, H., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., Davison, A. J.,** 2019. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). *Arch Virol* **164**, 943-946

**Simmonds, P., Tulloch, F., Evans, D. J., Ryan, M. D.,** 2015. Attenuation of dengue (and other RNA viruses) with codon pair recoding can be explained by increased CpG/UpA dinucleotide frequencies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3633-3634

**Smith, E. C., Sexton, N. R., Denison, M. R.,** 2014. Thinking outside the triangle: Replication fidelity of the largest RNA viruses. *Ann. Rev. Virol.* **1**, 111-132

**Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L. M., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W. J. M., Gorbalenya, A. E.,** 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* **331**, 991-1004

**Sola, I., Almazán, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L.,** 2015. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* **2**, 265-288

**Sola, I., Alonso, S., Zúñiga, S., Balasch, M., Plana-Duran, J., Enjuanes, L.,** 2003. Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J. Virol.* **77**, 4357-4369

**Sola, I., Mateos-Gomez, P. A., Almazan, F., Zúñiga, S., Enjuanes, L.,** 2011. RNA-RNA and RNA-protein interactions in coronavirus replication and transcription. *RNA Biol.* **8**, 237-248

**Sola, I., Moreno, J. L., Zúñiga, S., Alonso, S., Enjuanes, L.,** 2005. Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J. Virol.* **79**, 2506-2516

**Song, D., Moon, H., Kang, B.,** 2015a. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **4**, 166-176

- Song, D., Zhou, X., Peng, Q., Chen, Y., Zhang, F., Huang, T., Zhang, T., Li, A., Huang, D., Wu, Q., He, H., Tang, Y., 2015b.** Newly emerged porcine deltacoronavirus associated with diarrhoea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* **62**, 575-580
- Song, Q., Stone, S., Drebes, D., Greiner, L. L., Dvorak, C. M. T., Murtaugh, M. P., 2016.** Characterization of anti-porcine epidemic diarrhea virus neutralizing activity in mammary secretions. *Virus Res* **226**, 85-92
- Song, Z., Xu, Y., Bao, L., Zhang, L., Yu, P., Qu, Y., Zhu, H., Zhao, W., Han, Y., Qin, C., 2019.** From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses* **11**,
- St-Jean, J. R., Desforges, M., Almazan, F., Jacomy, H., Enjuanes, L., Talbot, P. J., 2006.** Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* **80**, 3670-3674
- Stadler, J., Zoels, S., Fux, R., Hanke, D., Pohlmann, A., Blome, S., Weissenbock, H., Weissenbacher-Lang, C., Ritzmann, M., Ladinig, A., 2015.** Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in southern Germany. *BMC Vet Res* **11**, 142
- Stauff, C. B., Shen, S. H., Song, Y., Gorbatshevych, O., Asare, E., Futcher, B., Mueller, S., Payne, A., Brecher, M., Kramer, L., Wimmer, E., 2018.** Extensive recoding of dengue virus type 2 specifically reduces replication in primate cells without gain-of-function in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS One* **13**, e0198303
- Stauff, C. B., Song, Y., Gorbatshevych, O., Pantoja, P., Rodriguez, I. V., Futcher, B., Sariol, C. A., Wimmer, E., 2019.** Extensive genomic recoding by codon-pair deoptimization selective for mammals is a flexible tool to generate attenuated vaccine candidates for dengue virus 2. *Virology* **537**, 237-245
- Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martinez-Sobrido, L., Garcia-Sastre, A., Weber, F., Kochs, G., 2007.** The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* **361**, 304-315
- Stockinger, B., Omenetti, S., 2017.** The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 535-544

- Sturman, L. S., Holmes, K. V., Behnke, J.**, 1980. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J. Virol.* **33**, 449-462
- Sturman, L. S., V., H. K.**, 1977. Characterization of a coronavirus. II. Glycoproteins of the viral envelope: tryptic peptide analysis. *Virology* **77**, 650-660
- Su, Y., Hou, Y., Wang, Q.**, 2019. The enhanced replication of an S-intact PEDV during coinfection with an S1 NTD-del PEDV in piglets. *Vet Microbiol* **228**, 202-212
- Subissi, L., Imbert, I., Ferron, F., Collet, A., Coutard, B., Decroly, E., Canard, B.**, 2014. SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12-16: replicative enzymes as antiviral targets. *Antiviral Res.* **101**, 122-130
- Subramaniam, S., Yugo, D. M., Heffron, C. L., Rogers, A. J., Sooryanarain, H., LeRoith, T., Overend, C., Cao, D., Meng, X. J.**, 2018. Vaccination of sows with a dendritic cell-targeted porcine epidemic diarrhea virus S1 protein-based candidate vaccine reduced viral shedding but exacerbated gross pathological lesions in suckling neonatal piglets. *J. Gen. Virol.* **99**, 230-239
- Sun, D., Wang, X., Wei, S., Chen, J., Feng, L.**, 2016. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review. *J. Vet. Med. Sci.* **78**, 355-363
- Sun, M., Ma, J., Yu, Z., Pan, Z., Lu, C., Yao, H.**, 2017. Identification of two mutation sites in spike and envelope proteins mediating optimal cellular infection of porcine epidemic diarrhea virus from different pathways. *Vet Res* **48**, 44
- Surjit, M., Lal, S. K.**, 2008. The SARS-CoV nucleocapsid protein: a protein with multifarious activities. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 397-405
- Surjit, M., Liu, B., Chow, V. T., Lal, S. K.**, 2006. The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 10669-10681
- Surjit, M., Liu, B., Jameel, S., Chow, V. T., Lal, S. K.**, 2004. The SARS coronavirus nucleocapsid protein induces actin reorganization and apoptosis in COS-1 cells in the absence of growth factors. *Biochem. J.* **383**, 13-18



- Surya, W., Li, Y., Verdia-Baguena, C., Aguilera, V. M., Torres, J., 2015.** MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus Res.* **201**, 61-66
- Suzuki, T., Hayakawa, J., Ohashi, S., 2017.** Complete Genome Characterization of the Porcine Deltacoronavirus HKD/JPN/2016, Isolated in Japan, 2016. *Genome Announc* **5**,

## T

---

- Tekes, G., Spies, D., Bank-Wolf, B., Thiel, V., Thiel, H. J., 2012.** A reverse genetics approach to study feline infectious peritonitis. *J. Virol.* **86**, 6994-6998
- Thachil, A., Gerber, P. F., Xiao, C. T., Huang, Y. W., Opriessnig, T., 2015.** Development and application of an ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies. *PLoS One* **10**, e0124363
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., Siddell, S., 2001.** Infectious RNA transcribed *in vitro* from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* **82**, 1273-1281
- Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Wessbrich, B., Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E., Ziebuhr, J., 2003.** Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.* **84**, 2305-2315
- Tobler, K., Ackermann, M., 1998.** Comparison of the Di- and trinucleotide frequencies from the genomes of nine different coronaviruses. *Advances in experimental medicine and biology* **440**, 801-804
- Tong, S., Conrardy, C., Ruone, S., Kuzmin, I. V., Guo, X., Tao, Y., Niezgoda, M., Haynes, L., Agwanda, B., Breiman, R. F., Anderson, L. J., Rupprecht, C. E., 2009.** Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 482-485
- Tooze, J., Tooze, S., Warren, G., 1984.** Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell. Biol.* **33**, 281-294
- Tooze, J., Tooze, S. A., Fuller, S. D., 1987.** Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-golgi network of atT20 cells. *J. Cell Biol.* **105**, 1215-1226

**Tsai, T. L., Lin, C. H., Lin, C. N., Lo, C. Y., Wu, H. Y.,** 2018a. Interplay between the Poly(A) Tail, Poly(A)-Binding Protein, and Coronavirus Nucleocapsid Protein Regulates Gene Expression of Coronavirus and the Host Cell. *J Virol* **92**,

**Tsai, T. L., Su, C. C., Hsieh, C. C., Lin, C. N., Chang, H. W., Lo, C. Y., Lin, C. H., Wu, H. Y.,** 2018b. Gene Variations in Cis-Acting Elements between the Taiwan and Prototype Strains of Porcine Epidemic Diarrhea Virus Alter Viral Gene Expression. *Genes (Basel)* **9**,

**Tu, C. F., Chuang, C. K., Hsiao, K. H., Chen, C. H., Chen, C. M., Peng, S. H., Su, Y. H., Chiou, M. T., Yen, C. H., Hung, S. W., Yang, T. S., Chen, C. M.,** 2019. Lessening of porcine epidemic diarrhoea virus susceptibility in piglets after editing of the CMP-N-glycolylneuraminic acid hydroxylase gene with CRISPR/Cas9 to nullify N-glycolylneuraminic acid expression. *PLoS One* **14**, e0217236

**Tulloch, F., Atkinson, N. J., Evans, D. J., Ryan, M. D., Simmonds, P.,** 2014. RNA virus attenuation by codon pair deoptimisation is an artefact of increases in CpG/UpA dinucleotide frequencies. *Elife* **3**, e04531

## U

---

**Utiger, A., Tobler, K., Bridgen, A., Ackermann, M.,** 1995. Identification of the membrane protein of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Genes* **10**, 137-148

## V

---

**Vabret, N., Bhardwaj, N., Greenbaum, B. D.,** 2017. Sequence-Specific Sensing of Nucleic Acids. *Trends Immunol* **38**, 53-65

**van Beurden, S. J., Berends, A. J., Kramer-Kuhl, A., Spekreijse, D., Chenard, G., Philipp, H. C., Mundt, E., Rottier, P. J. M., Verheije, M. H.,** 2017. A reverse genetics system for avian coronavirus infectious bronchitis virus based on targeted RNA recombination. *Virol. J.* **14**, 109

**van den Worm, S. H., Eriksson, K. K., Zevenhoven, J. C., Weber, F., Züst, R., Kuri, T., Dijkman, R., Chang, G., Siddell, S. G., Snijder, E. J., Thiel,**

- V.,Davidson, A. D.**, 2012. Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS One* **7**, e32857
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J.,Berkhout, B.**, 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**, 368-373
- Vanhee, M., Delputte, P. L., Delrue, I., Geldhof, M. F.,Nauwynck, H. J.**, 2009. Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus-neutralizing antibodies. *Vet Res* **40**, 63
- Verdia-Baguená, C., Nieto-Torres, J. L., Alcaraz, A., Dediego, M. L., Torres, J., Aguilera, V. M.,Enjuanes, L.**, 2012. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. *Virology* **432**, 485-494
- Vlasova, A. N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M. R., Rossow, K. D., Rovira, A., Collins, J.,Saif, L. J.**, 2014. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1620-1628

## W

---

- Wada, M., Lokugamage, K. G., Nakagawa, K., Narayanan, K.,Makino, S.**, 2018. Interplay between coronavirus, a cytoplasmic RNA virus, and nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E10157-E10166
- Walker, P. J., Bonami, J. R., Boonsaeng, V., Chang, P. S., Cowley, J. A., Enjuanes, L., Flegel, T. W., Lightner, D. V., Loh, P. C., Snijder, E. J.,Tang, K.**, 2005. *Roniviridae*, en: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U.,Ball, L. A., *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California, pp. 975-979
- Walsh, E. E., Shin, J. H.,Falsey, A. R.**, 2013. Clinical impact of human coronaviruses 229E and OC43 infection in diverse adult populations. *J. Infect. Dis.* **208**, 1634-1642

- Wang, B., Yang, C., Tekes, G., Mueller, S., Paul, A., Whelan, S. P., Wimmer, E.,** 2015. Recoding of the vesicular stomatitis virus L gene by computer-aided design provides a live, attenuated vaccine candidate. *MBio* **6**, e00237-00215
- Wang, H., Gu, J., Xing, G., Qiu, X., An, S., Wang, Y., Zhang, C., Liu, C., Gong, W., Tu, C., Su, S., Zhou, J.,** 2019. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 in China between 1999-2017. *Transbound Emerg Dis* **66**, 599-605
- Wang, K., Boysen, C., Shizuya, H., Simon, M. I., Hood, L.,** 1997. Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *BioTechniques* **23**, 992-994
- Wang, K., Lu, W., Chen, J., Xie, S., Shi, H., Hsu, H., Yu, W., Xu, K., Bian, C., Fischer, W. B., Schwarz, W., Feng, L., Sun, B.,** 2012. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett.* **586**, 384-391
- Wang, L., Byrum, B., Zhang, Y.,** 2014. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 917-919
- Wang, Q., Vlasova, A. N., Kenney, S. P., Saif, L. J.,** 2019. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Curr Opin Virol* **34**, 39-49
- Wang, X., Chen, J., Shi, D., Shi, H., Zhang, X., Yuan, J., Jiang, S., Feng, L.,** 2016. Immunogenicity and antigenic relationships among spike proteins of porcine epidemic diarrhea virus subtypes G1 and G2. *Arch Virol* **161**, 537-547
- Wang, X., Ohnstad, M., Nelsen, A., Nelson, E.,** 2017. Porcine epidemic diarrhea virus does not replicate in porcine monocyte-derived dendritic cells, but activates the transcription of type I interferon and chemokine. *Vet. Microbiol.* **208**, 77-81
- Wesley, R. D., Woods, R. D., Cheung, A. K.,** 1991. Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* **65**, 3369-3373
- Wesley, R. D., Woods, R. D., Correa, I., Enjuanes, L.,** 1988. Lack of protection *in vivo* with neutralizing monoclonal antibodies to transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.* **18**, 197-208
- Wimmer, E., Paul, A. V.,** 2011. Synthetic poliovirus and other designer viruses: what have we learned from them? *Annu Rev Microbiol* **65**, 583-609

- Wong, A. C. P., Li, X., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y.,** 2019. Global epidemiology of bat coronaviruses. *Viruses* **11**, 174
- Wongthida, P., Liwnaree, B., Wanasen, N., Narkpuk, J., Jongkaewwattana, A.,** 2017. The role of ORF3 accessory protein in replication of cell-adapted porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). *Arch Virol* **162**, 2553-2563
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., Wong, B. H., Poon, R. W., Cai, J. J., Luk, W. K., Poon, L. L., Wong, S. S., Guan, Y., Peiris, J. S., Yuen, K. Y.,** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* **79**, 884-895
- Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lau, C. C., Tsang, A. K., Lau, J. H., Bai, R., Teng, J. L., Tsang, C. C., Wang, M., Zheng, B. J., Chan, K. H., Yuen, K. Y.,** 2012. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* **86**, 3995-4008
- Wood, E. N.,** 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet Rec* **100**, 243-244
- Woods, R. D., Wesley, R. D.,** 1998. Transmissible gastroenteritis coronavirus carrier sow. *Advances in experimental medicine and biology* **440**, 641-648
- Wu, Y. H., Kuo, W. C., Wu, Y. J., Yang, K. T., Chen, S. T., Jiang, S. T., Gordy, C., He, Y. W., Lai, M. Z.,** 2014. Participation of c-FLIP in NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. *Cell Death Differ.* **21**, 451-461

## **X**

---

- Xu, X., Zhang, H., Zhang, Q., Dong, J., Liang, Y., Huang, Y., Liu, H. J., Tong, D.,** 2013a. Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression. *Virol. J.* **10**, 26
- Xu, X., Zhang, H., Zhang, Q., Huang, Y., Dong, J., Liang, Y., Liu, H. J., Tong, D.,** 2013b. Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression. *Vet. Microbiol.* **164**, 212-221

## Y

---

- Yang, D. K., Kim, H. H., Lee, S. H., Yoon, S. S., Park, J. W., Cho, I. S.,** 2018. Isolation and characterization of a new porcine epidemic diarrhea virus variant that occurred in Korea in 2014. *J. Vet. Sci.* **19**, 71-78
- Yang, J. S., Song, D. S., Kim, S. Y., Lyoo, K. S., Park, B. K.,** 2003. Detection of porcine circovirus type 2 in feces of pigs with or without enteric disease by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* **15**, 369-373
- Ye, Y., Hauns, K., Langland, J. O., Jacobs, B. L., Hogue, B. G.,** 2007. Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *J. Virol.* **81**, 2554-2563
- Yoshimura, A., Wakabayashi, Y., Mori, T.,** 2010. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem* **147**, 781-792
- Youn, S., Collisson, E. W., Machamer, C. E.,** 2005. Contribution of trafficking signals in the cytoplasmic tail of the infectious bronchitis virus spike protein to virus infection. *J. Virol.* **79**, 13209-13217
- Yount, B., Denison, M. R., Weiss, S. R., Baric, R. S.,** 2002. Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.* **76**, 11065-11078
- Yount, B., Roberts, R. S., Sims, A. C., Deming, D., Frieman, M. B., Sparks, J., Denison, M. R., Davis, N., Baric, R. S.,** 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J. Virol.* **79**, 14909-14922
- Yu, Q., Wang, X., Fan, X.,** 2017. A New Adjuvant MTOM Mediates Mycobacterium tuberculosis Subunit Vaccine to Enhance Th1-Type T Cell Immune Responses and IL-2(+) T Cells. *Front Immunol* **8**, 585
- Yuan, X., Lin, H., Li, B., He, K., Fan, H.,** 2017. Efficacy and immunogenicity of recombinant swinepox virus expressing the truncated S protein of a novel isolate of porcine epidemic diarrhea virus. *Arch. Virol.* **162**, 3779-3789

## Z

---

- Zhang, N., Channappanavar, R., Ma, C., Wang, L., Tang, J., Garron, T., Tao, X., Tasneem, S., Lu, L., Tseng, C. T., Zhou, Y., Perlman, S., Jiang, S., Du, L., 2016.** Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Cell Mol. Immunol.* **13**, 180-190
- Zhang, Q., Ke, H., Blikslager, A., Fujita, T., Yoo, D., 2018.** Type III Interferon Restriction by Porcine Epidemic Diarrhea Virus and the Role of Viral Protein nsp1 in IRF1 Signaling. *J Virol* **92**,
- Zhang, Q., Ma, J., Yoo, D., 2017.** Inhibition of NF-kappaB activity by the porcine epidemic diarrhea virus nonstructural protein 1 for innate immune evasion. *Virology* **510**, 111-126
- Zhang, Q., Shi, K., Yoo, D., 2016.** Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1. *Virology* **489**, 252-268
- Zhang, Q., Yoo, D., 2016.** Immune evasion of porcine enteric coronaviruses and viral modulation of antiviral innate signaling. *Virus Res.* **226**, 128-141
- Zhang, X., Hasoksuz, M., Spiro, D., Halpin, R., Wang, S., Stollar, S., Janies, D., Hadya, N., Tang, Y., Ghedin, E., Saif, L., 2007.** Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology* **358**, 424-435
- Zhang, X., Shi, H., Chen, J., Shi, D., Li, C., Feng, L., 2014.** EF1A interacting with nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus and plays a role in virus replication. *Vet. Microbiol.* **172**, 443-448
- Zhou, B., Liu, J., Wang, Q., Liu, X., Li, X., Li, P., Ma, Q., Cao, C., 2008.** The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cell cytokinesis and proliferation by interacting with translation elongation factor 1alpha. *J. Virol.* **82**, 6962-6971
- Zhou, P., Fan, H., Lan, T., Yang, X. L., Shi, W. F., Zhang, W., Zhu, Y., Zhang, Y. W., Xie, Q. M., Mani, S., Zheng, X. S., Li, B., Li, J. M., Guo, H., Pei, G. Q., An, X. P., Chen, J. W., Zhou, L., Mai, K. J., Wu, Z. X., Li, D., Anderson, D. E., Zhang, L. B., Li, S. Y., Mi, Z. Q., He, T. T., Cong, F., Guo, P. J., Huang, R., Luo, Y., Liu, X. L., Chen, J., Huang, Y., Sun, Q., Zhang, X.**

- L., Wang, Y. Y., Xing, S. Z., Chen, Y. S., Sun, Y., Li, J., Daszak, P., Wang, L. F., Shi, Z. L., Tong, Y. G., Ma, J. Y., 2018.** Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* **556**, 255-258
- Zhou, Y., Chen, C., Chen, Y., Liu, Z., Zheng, J., Wang, T., Luo, H., Liu, Y., Shan, Y., Fang, W., Li, X., 2019.** Effect of route of inoculation on innate and adaptive immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling pigs. *Vet Microbiol* **228**, 83-92
- Zhu, X., Wang, D., Zhou, J., Pan, T., Chen, J., Yang, Y., Lv, M., Ye, X., Peng, G., Fang, L., Xiao, S., 2017.** Porcine Deltacoronavirus nsp5 Antagonizes Type I Interferon Signaling by Cleaving STAT2. *J Virol* **91**,
- Ziebuhr, J., 2005.** The coronavirus replicase, en: Enjuanes, L., *Coronavirus replication and reverse genetics*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 57-94
- Zimmer, G., 2010.** RNA replicons - a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. *Viruses* **2**, 413-434
- Zuniga, S., Sola, I., Alonso, S., Enjuanes, L., 2004.** Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol* **78**, 980-994
- Zuniga, S., Sola, I., Cruz, J. L., Enjuanes, L., 2009.** Role of RNA chaperones in virus replication. *Virus Res* **139**, 253-266
- Zuniga, S., Sola, I., Moreno, J. L., Sabella, P., Plana-Duran, J., Enjuanes, L., 2007.** Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* **357**, 215-227
- Zuñiga, S., Cruz, J. L., Sola, I., Mateos-Gomez, P. A., Palacio, L., Enjuanes, L., 2010.** Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J. Virol.* **84**, 2169-2175
- Zuñiga, S., Pascual-Iglesias, A., Sanchez, C. M., Sola, I., Enjuanes, L., 2016.** Virulence factors in porcine coronaviruses and vaccine design. *Virus Res.* **226**, 142-151
- Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B. W., Ziebuhr, J., Szretter, K. J., Baker, S. C., Barchet, W., Diamond, M. S., Siddell, S. G., Ludewig, B., Thiel, V., 2011.** Ribose 2'-O-methylation provides



a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. Nat. Immunol. **12**, 137-143

**Zust, R., Cervantes-Barragan, L., Kuri, T., Blakqori, G., Weber, F., Ludewig, B., Thiel, V.,** 2007. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. PLoS Pathog. **3**, e109